

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Telin Noorväli

**Makroliidide interaktsioonid
ribosoomi tunnelis kasvava peptiidiga**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: PhD Tanel Tenson

TARTU 2013

SISUKORD

| | |
|--|----|
| SISUKORD | 2 |
| KASUTATUD LÜHENDID | 4 |
| SISSEJUHATUS | 5 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE | 6 |
| 1.1 Makroliidide struktuurid | 6 |
| 1.2 Kliiniline kasutamine | 7 |
| 1.3 Ribosoomi ehitus | 8 |
| 1.4 Makroliidide seondumissait | 10 |
| 1.5 Makroliidide toimemehhanism | 12 |
| 1.5.1 Valgusünteesi inhibitsioon | 12 |
| 1.5.2 Valikuline valgusüntees | 13 |
| 1.5.3 Ebatüüpiline ribosoomi assambleerumine | 15 |
| 1.6 Translatsiooniline seisak | 15 |
| 1.7 Resistentsusmehhanismid | 16 |
| 1.7.1 Resistentsus MLS_B grupi antibiootikumide vastu | 16 |
| 1.7.2 Makroliidide resistentsusgeenide ekspressiooni üldpõhimõtted | 16 |
| 1.7.3 <i>erm</i> geenid | 18 |
| 1.7.3.1 <i>ermC</i> translatsioon | 18 |
| 1.7.3.2 Teised <i>erm</i> geenid | 19 |
| 1.7.3.3 Signaali ülekanne | 20 |
| 2. UURIMUS | 22 |
| 2.1 Töö eesmärgid | 22 |
| 2.2 Materjal ja metoodika | 22 |
| 2.3 Tulemused. Arutelu | 22 |
| 2.3.1 Peatatud ribosoomikomplekside uurimine | 23 |
| 2.3.2 Uute antibiootikumide väljatöötamine | 24 |
| 2.3.2.1 Induktsioonimehhanismide “petmine” | 24 |
| 2.3.2.2 Makroliidi struktuuri olulised aspektid | 25 |
| 2.3.2.3 Liigispetsiifiline suund | 26 |
| 2.3.3 Lõpetuseks | 26 |
| KOKKUVÕTE | 27 |
| SUMMARY | 28 |

| | |
|---------------------------|----|
| TÄNUAVALDUSED..... | 29 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 30 |
| LISAD | 39 |
| Lisa 1. | 39 |
| Lisa 2. | 42 |
| LIHTLITSENTS..... | 44 |

KASUTATUD LÜHENDID

Å - ongström = 10^{-10} m

ABC - *ATP binding cassette*; ATP seondav kassett

Cfr – multiresistentsust põhjustav 23S ribosomaalse RNA metüültransferaas

Erm - *Erythromycin ribosome methylase*; erütromütsiini ribosoomi-metülaas

MFS - *major facilitator superfamily*; peamine abistaja superperekond

MIC - *minimum inhibitory concentration*; minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon

MifM - valke membraani lisava ja sekreteeriva valgu YidC2 geeni liiderpeptiid

MLS_B - *macrolide-lincosamide-streptogramin B*; makroliid-linkosamiid-streptogramiin B

mRNA - *messenger RNA*; informatsiooni RNA

nt - nukleotiid

ORF - *open reading frame*; avatud lugemisraam

rRNA - *ribosome RNA*; ribosoomaalne RNA

SecM - sekretsioonivalgu SecA geeni liiderpeptiid

TnaC - *tryptophanase leader peptide*; trüptofanaasi geeni liiderpetiid

tRNA - *transport RNA*; transport-RNA

SISSEJUHATUS

Makroliidid on tähtis antibiootikumide rühm, mis on mitmete patogeenide vastu tõhusaks raviks. Makroliidide molekulis on makrotsükline laktoonring, mis sisaldab 14-16 süsiniku aatomit ja millega on seondunud üks või enam suhkrut.

Erütromütsiin A, *Saccharopolyspora erythraea* poolt toodetud looduslik antibiootikum, oli esimene makroliid, mis võeti bakteriaalsete infektsioonide raviks kasutusele juba 1950-date alguses (McGuire *et al.*, 1952). Sellest ajast tänapäevani hinnatakse nende ravivõimet ja madalat toksilisust. Pidevalt käiv võidujooks patogeenide resistentsuse ja uute antibiootikumide loomise vahel on tootnud makroliidide uued põlvkonnad, millel on paremad omadused ja arendustöö käib järjest edasi. Selle aluseks on, aga, antibiootikumide seondumise ja toime parem mõistmine.

Makroliidid inhibeerivad bakterikasvu seondudes ribosoomiga ja blokeerides valgusünteesi.

Viimaste aastate arengud on toonud uusi andmeid makroliididega seotud mehhanismidest bakterirakkudes, sealhulgas resistentsuse mehhanismidest. Oluline on arusaam ribosoomis tekkiva peptiidahela ja ribosomaalse peptiidi-väljumistunneli komponentide seostest, kui rakutegevuse regulaatorist.

Töö on koostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

Töö eesmärgid:

1. Anda ülevaade makroliidide seondumisest ribosoomiga.
2. Anda ülevaade makroliidide toimemehhanismidest.
3. Anda ülevaade makroliidide interaktsioonidest ribosoomi tunnelis kasvavate peptiididega.
4. Pakkuda välja uusi suundi makroliidi poolt peatatud ribosoomikomplekside uurimiseks
5. Pakkuda välja uusi suundi uute antibiootikumide väljatöötamiseks

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Antud töö kirjanduse ülevaate peatükid 1.1 – 1.5 põhinevad Kannani ja Mankini 2011. aasta artiklil.

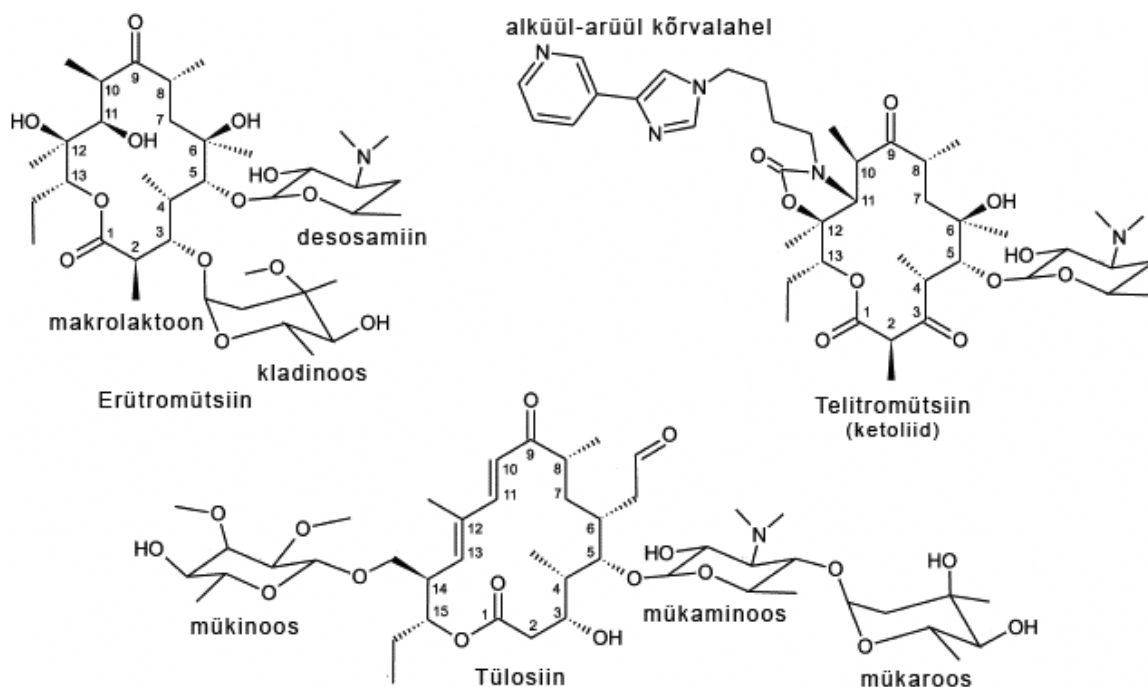
1.1 Makroliidide struktuurid

Makroliide iseloomustab 14-, 15- või 16-aatomiline makrolaktoonring, mille külge kinnitub mitmeid erinevaid neutraalseid või aminosuhkruid ja muid kõrvalahelaid. Erütromütsiin, mida võib pidada makroliidide prototübiks, koosneb 14-liikmelisest laktoonringist, mille küljes on kaks suhkrut, C3 positsioonis kladinoos ja C5 positsioonis desosamiin (Joonis 1).

Pool sünteetilised erütromütsiini derivaadid nagu nt klaritromütsiin, asitromütsiin, roksitromütsiin ja oleandomütsiin kuuluvad makroliidide teise põlvkonda. Pool sünteetisel asitromütsiinil on erütromütsiini makrolaktoonring laiendanud lämmastiku aatomi võrra. 16-aatomilise laktoonringiga makroliididel, nagu tülosiinil ja karbomütsiinil on laiendatud disahhariid C5 positsioonis (Joonis 1) ja tihti on neil ka lisaks mitmeid kõrvalahelaid makrolaktoonringi küljes (Ōmura, 2002).

Ketoliidid on makroliidide uuem põlvkond, mille aluseks on 14-liikmeline laktoonring. Ketoliide iseloomustavad ketogrupp, mis asendab laktoonringi kolmandas positsioonis kladinoosi ja alküül-arüül kõrvalahelad. Tuntuimal ketoliidil, telitromütsiinil, on lisaks ketoonile lisatud laktoonringile karbamaatring, viimasele kinnitub alküül-arüül ahel (Joonis 1)(Zhong & Shortridge, 2001; Schlünzen, 2003). Mõned kliiniliselt paljutöötavad ketoliidid on lisaks fluoreeritud positsioonis C2.(Putnam *et al.*, 2010; Llano-Sotelo *et al.*, 2010)

Nii makrolaktoonring kui kõrvalahelad mõjutavad ravimi ribosoomi külge seondumise affiinsust. Sellegi poolest on makrolaktoonringi muutustel vähe mõju viisile kuidas ravim seondub või inhibeerib translatsiooni. Kõrvalahelate struktuur mõjutab, aga, otseselt interaktsioone konkreetsete rRNA jääkidega, makroliidi toimemehhanismi ja kalduvust resistentsus-mehhanismide käivitamiseks (Hansen *et al.*, 2002; Dunkle *et al.*, 2010).



Joonis 1. Makroliidide erütromütsiini ja tülosiini ja ketoliidi telitromütsiini keemiline struktuur. Erütromütsiini ja telitromütsiini on 14-liikmeline laktoonring, tülosiini 16-liikmeline laktoonring (Bogdanov *et al.*, 2010 järgi).

1.2 Kliiniline kasutamine

Makroliide kasutatakse tavapäraselt hingamisteede infektsioonide raviks, aga ka naha pehme koe, urogenitaalsete ja orodentaalsete infektsioonide raviks. Enamus makroliide on bakteriostaatilised, st nad peatavad rakkude kasvu. Erütromütsiini kasutatakse efektiivselt mitmete Gram-positiivsete patogeensete bakterite, nagu näiteks *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* ja *Enterococcus sp.* vastu, aga ka mõnede Gram-negatiivsete bakterite nagu *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis* ja *Haemophilus influenzae* vastu ning samuti on efektiivne rakusiseste (nn. atüüpiliste) patogeenide nagu *Mycoplasma sp.*, *Legionella sp.* ja *Chlamydia sp.* vastu (Kannan *et al.*, 2011).

Makroliidide teise põlvkonna ravimid, nagu klaritromütsiin, roksitromütsiin ja asitromütsiin, on kõrgema happetaluvusega, parema suukaudse biolahustuvusega ja laiema antimikroobse spektriga (Blondeau *et al.*, 2002). Kolmanda põlvkonna makroliididest ketoliididel on tuvastatud suurem kliiniline võimekus võrreldes oma eellastega, nad inhibeerivad baktereid madalamatel ravimikontsentratsioonidel ja lisaks näitavad suurenenud bakteritsiidset aktiivsust mõnede patogeenide vastu (Ackermann & Rodloff, 2003; Hamilton-Miller & Shah, 1998).

16-liikmelise makrolaktoonringiga makroliide kasutatakse laialdaselt veterinaarias ja harvem ka inimeste raviks.

1.3 Ribosoomi ehitus

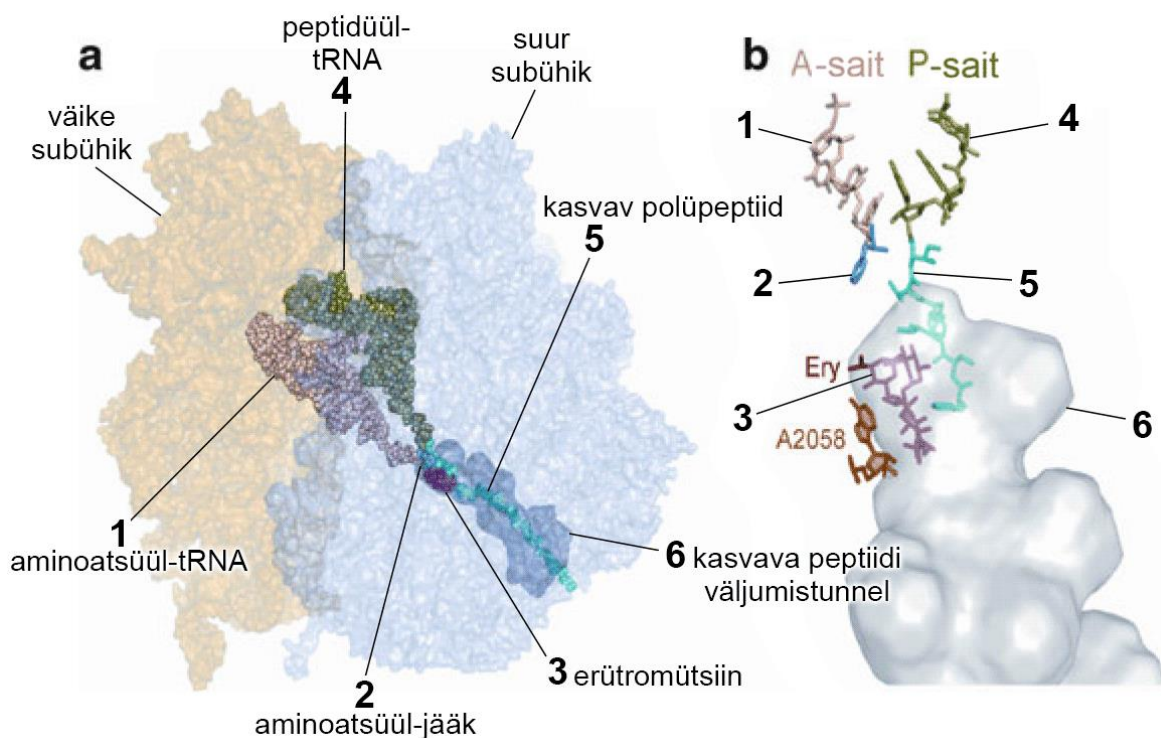
Ribosoom on makromolekulaarne mitmesubühikuline masin, kus toimub valkude sünteesi esmane etapp (translatsioon). Ribosoomid koosnevad rRNA-st ja ribosomaalsetest valkudest. Ribosoom on üks parimaid rakusiseseid antibiootikumide sihtmärke, kuna valgusünteesi häirimine peatab bakterite kasvu, aga eukarüootse peremehe rakkude tegevust ei sega, sest prokarüootse ja eukarüootsete ribosoomide struktuurid on sel määral erinevad.

Bakterite ribosoomi molekulmass on umbes 2,5 millionit daltonit. Bakteriaalne 70S (S - sedimentatsiooni koefitsient Svedbergi ühikutes) ribosoom koosneb kahest subühikust - väikesest 30S ja suurest 50S subühikust. Umbes kaks kolmandikku ribosoomi massist moodustab RNA ja ühe kolmandiku valgud. Kõige rohkem uuritud *Escherichia coli* ribosoom sisaldab kolme rRNA molekuli ja arvukalt valke. Selle suurem subühik koosneb 23S rRNA-st (2904 nt), 5S rRNA-st (120 nt) ja 33-st valgust, mida tähistatakse tähega L (*large*). Väiksem subühik koosneb 16S rRNA-st (1551 nt) ja 21-st valgust, mida tähistatakse S-ga (*small*). (Wilson ja Nierhaus, 2003; Moore ja Steitz, 2003; Wilson *et al.*, 2002).

Väikesel subühikul asuv dekodeerimis-keskus valib mRNA koodonijärjestuse alusel vastava aminoatsüül-tRNA. Aminohapped järjestatakse peptiidahelaks suure subühiku peptidüültransferaases tsentris. Ribosoomis on kolm tRNA seondumise saiti. Esmalt seondub aminoatsüül-tRNA aminoatsüül-saiti e. A-saiti. Peptidüül-saidis e. P-saidis toimub aminohappe lisamine kasvavale polüpeptiidahelale. Deatsüleeritud tRNA, millelt aminohape on seotud polüpeptiidahelasse, liigub edasi E-saiti (inglise keeles - *exit*) ja eemaldatakse ribosoomist (Wilson, 2002). Ribosoomi peptidüültransferaases tsentris puuduvad valgud ja peptiidside teket katalüüsib 23S rRNA, täpsemalt selle V domään. Ribonukleiinhappe sellise katalüütilise aktiivsuse tõttu kutsutakse ribosoomi ka ribosüümiks. Valkudele on omistatud ribosoomis peamiselt karkassi moodustavat rolli, kuna aktiivsaitides nad otseselt ei osale, kuigi mitmetel valkudel on ka spetsiifilisemaid funktsioone (Moore ja Steitz, 2003).

Värselt sünteesitud polüpeptiid väljub ribosoomist 50S subühikus asuva kasvava peptiidi väljumistunneli kaudu, mis algab peptidüültransferaasse tsentri juurest ja lõppeb suure subühiku tsütoplasmapoolsel küljel (Joonis 2). Kasvava peptiidi väljumistunnel on ligikaudu 100 Å pikk, mahutades korraga 30-50 aminohappe pikkuse lõigu valmivast polüpeptiididst. (Yonath *et al.*, 1986; Ban *et al.*, 2000; Nissen *et al.*, 2000; Voss *et al.*, 2006). Tunneli keskmine diameeter on 20 Å. Lähikäigu seinad koosnevad peamiselt 23S rRNA-st. Umbes 30 Å kaugusel peptidüültransferaasest tsentrist kitsendavad ribosomaalsete valkude L4 ja L22

väljaulatuvad lingud tunneli ava 10 Å laiuseks. See on veel piisavalt ruumikas, et vastselt sünteesitud peptiidid saaksid takistusteta läbipääsu ribosoomist välja. Siiski pole see läbipääs kõigile vaba, nagu algselt arvati, vaid osad tekkivad peptiidid suudavad spetsiifiliselt seonduda tunneli seina komponentidega muutes translatsiooni kulgemise kiirust ja teatud juhtudel viia isegi translatsiooni peatumiseni (Tenson & Ehrenberg, 2002; Jenni & Ban, 2003). Peptiidi väljumistunneli peptiide-monitoorivad ja neid eristavad omadused on raku viis optimeerida geeniekspressiooni regulatsiooni, valkude sihtmärgistamist ja pakkimist (ülevaateartikkel Ito *et al.*, 2010).



Joonis 2. Kasvav peptiid ja makroliid ribosoomi väljumistunnelis. (a) 70S ribosoom on näidatud läbipaistvana, väike ja suur subühik on värvitud erinevalt. Tekkiva peptiidi väljumistunnelis asetseb 30 aminohappe pikkune kasvav polüpeptiid (5). Väljumistunnelisse on seondunud erütromütsiin (3). (b) Erütromütsiin väljumistunnelis. Peptidüül-tRNA (4) kannab 6 aminohappe pikkust kasvavat peptiidi (5). Tunnelis on näha 23S rRNA nukleotiidijätk A2058, mis osaleb ravimi seondumises ja mida Erm-tüüpi metüültransferaasid modifitseerivad. (Subramanian *et al.*, 2012 järgi)

Konkreetselt kasvava peptiidi äratundmine tunneli poolt ja ribosomaalne vastus võivad olla seotud rakusiseste mõjutajatega, väikeste metaboliitide või näiteks antibiootikumide seondumisega tunnelisse. Seda ribosoomi funktsiooni uuritakse aktiivselt ja ses vallas on uusi avastusi tehtud ka seoses erütromütsiini poolt indutseeritud *erm* geenide translatsiooni peatamise uurimisega, millest on edaspidi täpsemalt juttu.

23S rRNA on laialdaselt ja bakteriliikide kaupa erinevalt posttranskriptionaalselt modifitseeritud (Mengel-Jorgensen *et al.*, 2006; Kannan & Mankin, 2011). Ligikaudu üks kolmandik modifitseeritud 23S rRNA ribonukleotiidijääkidest on kogunenud klastrisse peptiidi väljumistunneli läheduses (Chow *et al.*, 2007) ja mõned neist otse mõjutavad rRNA lõike, mis moodustavad makroliidide seondumis-saidi. Posttranskriptsionaalne moditseerimine aitab sel moel kaasa liikidevahelisele varieeruvusele makroliidide seondumises ja toimes.

1.4 Makroliidide seondumissait

Makroliidid seonduvad kasvava peptiidi väljumistunneli algusesse, mis asub peptidüültransferaasse tsentri ja valkude L4 ja L22 poolt tekkinud ahenemise vahel (Joonis 2)(Bulkley *et al.*, 2010; Dunkle *et al.* 2010; Tu *et al.*, 2005), takistades peptiidahela kasvu ribosoomis. Seondumissait koosneb valdavalt 23S rRNA II ja V domääni nukleotiididest.

Makroliidide keskne makrolaktoonring loob hüdrofoobsed sidemed rRNA jääkidega 2057, 2611 ja 2058 (töös kasutatud *E. coli* nummerdust, kui pole märgitud teisiti), mis moodustavad tunneliseina peptiidtransferaasse tsentri kõrval. Enamustel saadaolevatest kõrg-resolutsioonilistest kristallograafilistest struktuuridest on makrolaktoonrõngas asunud lapiti vastu seina ja kõrvalahelad tungimas kas tunnelist peptiidtransferaasse tsentri poole või vastassuunas tunneli kitsenemise poole (Joonis 2) (Bulkley *et al.*, 2010; Dunkle *et al.* 2010; Tu *et al.*, 2005). Makroliidide C5 aminosuhkrud (desosamiin 14- ja 15-liikmeliste ringidega makroliidide puhul ja disahhariidi mükamiinoos suhkrujääk 16-liikmeliste ringidega makroliidide puhul) sirutuvad peptiidtransferaasse tsentri poole ja on tõmmatud vao ligi, mis tekib adeniniijääkide A2058 ja A2059 vahele. Ka vesinikside desosamiini 2'-OH ja A2058 N1 vahel aitab kaasa antibiootikumi sidumisele. C5 kõrvalahela seondumine A2058 ja A2059-ga on väga oluline - A2058 eksotsüklilise amiini dimetüleerimine erütromütsiini-resistentsete metüültransferaaside poolt (Erm valgud) või A2058 või A2059 mutatsioonid vähendavad drastiliselt ribosoomi affiinsust kõigi makroliidide vastu (Vester & Garrett, 1987; Weisblum, 1995).

Kuigi 14- ja 15-liikmelise ringiga makroliidide C5 desosamiin ei ulatu peptiidtransferaasesse tsentrisse, siis 16-liikmeliste makroliidide pikemad disahhariidsed kõrvalahelad on juba peptidüültransferaassele tsentrile lähemal ja võivad mõjutada peptiidsideme katalüüsi. Karbomütsiini ja josamütsiini disahhariidid on pikemad isovaleraadi võrra, mis ulatub otse

petidüültransferaasse tsentri A-saiti, takistades peptiidside sünteesi (Poulsen *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2002).

Erütromütsiini ja teise põvkonna makroliidide C3 kladinoosi suhkur on kontaktis nukleotiididega C2610 ja G2505 (Hansen *et al.*, 2002, Dunkle *et al.*, 2010). Kuigi C2610 mutatsioon ei mõju oluliselt antibiootikumi seondumisele ega tundlikkusele, on see nukleotiid tähtis ravimi ja kasvava peptiidahela vaheliseks interaktsiooniks. C2610 mutatsioonid mõjutavad kladinoosi-sisaldavate makroliidide võimet aktiveerida *erm* geene (Vazquez-Laslop *et al.*, 2011), millest on hiljem ka täpsemalt juttu.

Ketoliidide pikendatud alküül-arüül kõrvalahel ja täiendavad kõrvalahelad 16-liikmelise ringiga makroliididel kompenseerivad kladinoosi puudumist, kuna nad tõstavad ravimi affiinsust luues lisa interaktsioone nukleotiididega 23S rRNA domään II-s.

Kristallograafilised struktuurid *E. coli* või *Thermus thermophilus* ribosoomidega seotud telitromütsiiniga kinnitasid varasemalt välja pakutud tihedat kontakti kõrvalahela ja 23S rRNA domään II-s paikneva heeliks 35 silmusega (Bulkley *et al.*, 2010; Dunkle *et al.*, 2010). Sarnaselt ka tülosiini C14-le kinnituv mükinoos seondub alustega 748, 751 ja 752 heeliks 35-s silmuses (Hansen *et al.*, 2002). Mükinoosi ribosomaalsed kontaktid on olulised tülosiini seondumiseks, kuna siis kui need sidemed on kõrvaldatud A748 metüleerimise abil metüültransferaasi RlmAII poolt (samaaegselt A2058 monometüleerimisega), siis tülosiin ei suuda inhibeerida rakkude kasvu (Liu & Douthwaite, 2002).

Mõned 16-liikmelised makroliidid (nagu tülosiin) kannavad etüül-aldehüüd gruppi C6 positsioonis. Kristallograafilistes struktuurides nendest ravimitest kompleksis *Haloarcula marismortui* 50S subühikuga on näha pidev elektrontihedus, mis ühendab aldehüüdi gruppi ja A2062 eksotsüklilist amiini - see on kooskõlas ümberpöörduva kovalentsideme moodustamisega (Hansen *et al.*, 2002). Sarnast kovalentset sidet täheldati josamütsiini ja *Deinococcus radiodurans* 50S subühiku A2062 vahel (Pyetan *et al.*, 2007). Selle oletatava sideme kaotamist seostatakse ravimi vähenenud affiinsusega ja vähenenud võimega inhibeerida translatsiooni (Starosta *et al.*, 2010).

Mõned nukleotiidid, mis moodustavad makroliidide seondumis-saidi, näiteks 2057-2611 aluspaarid heeliksist 35, on arvestatavalt varieeruvad bakteriliikide vahel. Isegi nende konserveerunud rRNA jääkide asetus, mis osalevad ravimi seondumises, võib varieeruda liigispetsiifiliste interaktsioonide tõttu ravimi seondumise saiti piiravate mittekonserveerunud

nukletiididega. Seetõttu pole väga üllatav, et sama makroliidi molekuli täpne orientatsioon erinevate bakterite ribosoomi seostununa, võib olla oluliselt varieeruv (Hansel *et al.*, 2002).

Kuigi enamus sidemeid, mida makroliidid ribosoomiga loovad, sisaldavad rRNA-d, siis mõnede 16-liikmelise ringiga makroliidide pikad kõrvalahelad ja ketoliidid ulatuvad piisavalt kaugemale tunnelisse sisse, et kontakteeruda ribosomaalsete valkudega L4 ja L22, mis moodustavad väljumistunneli ahenemise u 20-35 Å peptidüültransferaasest tsentrist eemal (Ban *et al.*, 2000). Näiteks tülosiini C14-le kinnituv mükinoos interakteerub otseselt valguga L22 ning spiramütsiini C9-le seonduv forosamiin ulatub L4 lähedale (Hansen *et al.*, 2002). Mutatsioonid nendes valkudes kutsuvad esile resistentsuse mitmete makroliidide vastu (Moore & Sauer, 2008; Lovmar *et al.*, 2009). Ribosomaalsete valkude struktuur on vähem konserveerunud kui rRNA struktuur. Variatsioonid valgustruktuuris võivad aidata kaasa makroliidide ribosoomi-spetsiifilisele seondumisele.

1.5 Makroliidide toimemehhanism

1.5.1 Valgusünteesi inhibitsioon

On üldine arusaam, et makroliidid inhibeerivad valkude sünteesi takistades tekkiva peptiidahela kasvu ribosoomis. 14- ja 15-aatomilise laktoonringiga makroliidide mõju on translatsiooni alguse etappidele väike. Alles siis kui mõned esimesed aminohapped on polümeriseeritud ja kasvav polüpeptiid jõuab makroliidi seondumissaidini, peatub väljumistunnelis edasiliikumine ja peptidüül-tRNA dissotsieerub ribosoomist (Otaka & Kaji 1975; Menninger & Otto, 1982). Kladinoosi sisaldavad 14- ja 15-liikmelised makroliidid põhjustavad 6-9 aminohappe pikkuse peptiidiga peptidüül-tRNA dissotseerumise (Tenson *et al.*, 2003). Ketoliidid, millel C3 kladinoos puudub, lubavad polümeriseeruda 9-10 aminohappel (Tenson *et al.*, 2003). Peptidüül-tRNA akumulatsioon ja seega ka vaba tRNA defitsiit peetakse translatsiooni peatumise üheks peamiseks põhjuseks makroliididega kokkupuutunud rakkudes (Menninger & Otto, 1982).

Antibiootiumi molekul ei ole pidevalt seotud ribosoomiga, vaid toimub pidev dissotsieerumine ja uue molekuli seostumine. Kui ravim on peatanud tekkiva peptiidi kasvu, siis peptidüül-tRNA lahtituleku kiirusel ja ravimi spontaansel dissotseerumisel ribosoomist on olulised tagajärjed (Lovmar *et al.*, 2004). Kui antibiootikum dissotseerub enne peptidüül-tRNA lahkumist ja veel mõned aminohapped lisatakse polüpeptiidile enne, kui uus antibiootikumi molekul seondub, siis viiakse valgu süntees lõpule, kuna pikemad

polüpeptiidid takistavad ravimi uuesti-seondumist (Andersson & Kurland, 1987). See on üks põhjus, miks võib ka rakkude töötlemisel makroliidide kõrge kontsentratsiooniga näha mõningast valgusünteesi.

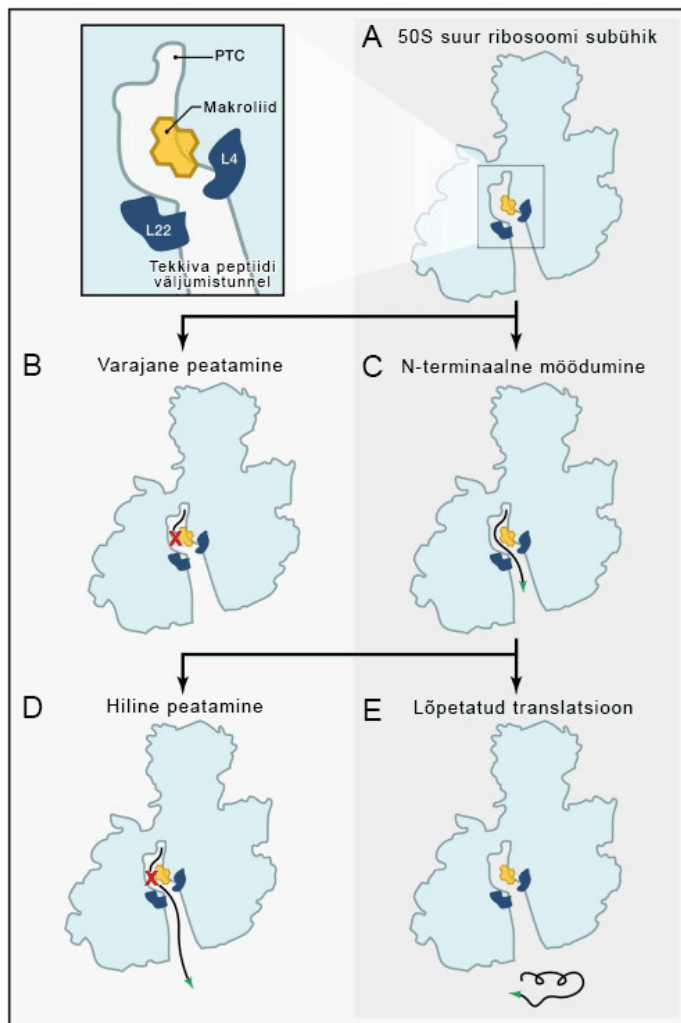
Peptidüül-tRNA dissotsatsiooni määr sõltub tekkiva peptiidi aminohappelisest järjestusest, pikkusest ja selle sidemetest kasvava peptiidi väljumistunneliga. Samas ravimi dissotsatsioonimäära mõjutab ravimi struktuur ja väljumistunnelis ravimi kinnituskohas olevate kontaktide spetsiifika (Lovmar *et al.*, 2006). Sellest järeldub, et valgusüntees, mida makroliididega töötlemise ajal saadakse lubada on valguspetsiifiline (Starosta *et al.*, 2010), ja seega ka liigispetsiifiline.

Erinevalt 14- ja 15-liikmeliste laktoonringidega makroliididest, mis ei takista mitme esimese aminohappe polümerisatsiooni, 16-liikmelised makroliidid, mis kannavad C5 positsioonis disahhariidi (mükaminoos-mükaroosi), suudavad blokeerida translatsiooni juba varasemas etapis. Mükaminoos-mükaroosi ahel mis ulatub peptidüültansferraasesse tsentrisse saab otse vahele segada teise või isegi esimese peptiidsideme moodustumisele (Douthwaite, 1992; Poulsen, 2000). Karbomütsiinis ja josamütsiinis on disahhariidi molekul pikendatud isovaleraadi võrra. Viimane ulatub aminohappe seondumistaskuni peptidüültransferraasse tsentri A-saidis ning võimaldab neil ravimitel mõjutada peptiidsideme tekkimist aminohappe spetsiifiliselt (Lovmar *et al.*, 2004). On mõeldav, et isegi väike nihe nende antibiootikumide C5 kõrvalahelate asukohas ribosoomis eri liikide puhul võiks mõjutada inhibitsiooni substraadispetsiifilisust.

1.5.2 Valikuline valgusüntees

Tekkiva peptiidi N-terminaalse osa aminohappeline struktuur määrab ära, kas valgusüntees makroliidiga ribosoomis nurjub peptidüül-tRNA lahtituleku näol, peatub (hoides peptidüül-tRNAd, kuid ei ole võimeline katalüüsima peptiidsideme moodustumist) või hoopis jätkub (Joonis 3)(Horinouchi & Weisblum, 1980; Ramu *et al.*, 2008; Kannan *et al.*, 2012). Varem on mõnedel tekkivatel peptiididel on tähendatud võimet antibiootikumi ribosoomist väljutada (Tenson *et al.*, 1997; Tripathi *et al.*, 1998). Hiljutine avastus on, et mõned spetsiifilised tekkivad peptiididjärjestused suudavad põigelda ka läbi makroliidi poolt blokeeritud väljumistunneli, lubades ravimiga-seotud ribosoomil sünteesida pikki polüpeptide (Joonis 3) (Kannan *et al.*, 2012).

Makroliidide kohalolek tekkiva peptiidi väljumistunnelis muudab translatsiooni valikuliseks - st sõltuvaks tekkiva peptiidahela järjestusest - mitte ainult valgusünteesi alguses, aga ka tekkiva peptiidi polümerisatsiooni hilisemas faasis. Mõned valguahelad kasvavad ilma probleemideta peale N-terminuse möödumist makroliidi seondumiskohast, aga teiste polüpeptiidide pikenemine peatatakse hilisemas faasis. Seda nähtust kutsutakse makroliidist sõltuvaks hiliseks translatsiooni peatamiseks (Joonis 3)(Kannan *et al.*, 2012). Sarnaselt N-terminaalse möödumisega on hiliseks peatamiseks määrava tähtsusega tekkiva peptiidi struktuur, spetsiifilisemalt selle peptidüültransferaasse tsentri poolne lõik (Kannan *et al.*, 2012).



Joonis 3. Valgusünteesi valikuline takistamine makroliidide poolt. (A) “Pooleks lõigatud” 50S subühik. On näha makroliidi (kollane) seondumis-sait väljumistunnelis. Makroliidid seonduvad peptiidi väljumistunneli seinale peptidüültransferaasse tsentri (PTC) ja ribosomaalsete valkude L4 ja L22 poolt moodustatud kitsenemise vahele. (B) Enamustel tekkivatel peptiididel on N-terminaalses osas selline järjestus (punane rist), mis ei suuda mööduda makroliidist takistusega tunneli osast, viies ribosoomi varajasse translatsioonilisse peatumisse. (C) Mõnedel valkudel on N-terminaalses osas erilised füsiokeemilised või struktuursed omadused (roheline nool), mis lubavad kasvaval polüpeptiidil mööduda antibiootikumist. (D) Polüpeptiidide, mis esialgu mööduvad makroliidi molekulist oma N-terminaalse otsaga, kasv võib hilisema sünteesi käigus peatuda, kui teatud allavoolu järjestus (punane rist) siseneb

makroliidiga seotud tunneli ossa. (E) Selliseid spetsiifilisi järjestusi ja omadusi mitterisaldavad peptiidid transleeritakse lõpuni. (Gamerding & Deuerling, 2012 järgi).

1.5.3 Ebatüüpiline ribosoomi assambleerumine

Kuna makroliidide mõju on sünteesitava-polüpeptiidi-spetsiifiline, siis bakterikultuuri töötlus madala antibiootikumi-kontsentratsiooniga viib mitmete - valkude tootmise erineva piiramiseni. Sealhulgas on erinevalt mõjutatud ka erinevate ribosomaalsete valkude süntees. Sellise ribosomaalsete valkude tasakaalust väljas oleva sünteesi tulemuseks on ebatüüpiline ribosoomi assambleerumine (Champney & Miller, 2002; Siibak *et al.*, 2009). Selline efekt võib tõsta ravimi inhibeerivat toimet.

1.6 Translatsiooniline seisak

Ribosomaalse tunneli läbimine teatud kasvavate polüpeptiidide poolt võib viia ribosoomi translatsioonilisse seisakusse - see on sündmus, mida kasutab rakk geeniekspressiooni reguleerimiseks, valkude pakkimiseks ja sihtmärgistamiseks (ülevaateartikkel Ito *et al.*, 2010). Järjestused, mis viivad ribosoomi peatamisele, paiknevad sünteesitud peptiidi C-terminaalses lõigus. Ribosoomi tunnelis asuvad sensorid, mis selliseid järjestusi ära tunnevad, paiknevad seega tunneli alguses, peptidüültransferaasse keskuse läheduses. Mitme tunnelialguse 23S rRNA nukleotiidi ja ribosomaalsete valkude L4 ja L22 kohta on näidatud, et nad osalevad eri peptiidide äratundmises (Cruz-Vera *et al.*, 2005; Nakatogawa & Ito, 2002; Vazquez-Laslop *et al.*, 2008; Lawrence *et al.*, 2008; Vazquez-Laslop *et al.*, 2010; Cruz-Vera *et al.*, 2007; Seidelt *et al.*, 2009; Fulle & Gohlke, 2009). Kui need sensorid detekteerivad spetsiifilise peptiidjärjestuse kohalolu peptiidi väljumistunnelis, kantakse signaal üle peptidüültransferaasse tsentri aktiiv-saiti, tõenäoliselt muutes ribosoomi struktuuris nukleotiidide konformatsiooni. Edasine peptiidsideme loomise takistamine viib ribosoomi translatsioonilisse seiskumisse (Cruz-Vera *et al.*, 2005; Nakatogawa & Ito, 2002; Vazquez-Laslop, 2010; Seidelt *et al.*, 2009; Fulle & Gohlke, 2009).

Tekkivate peptiidide poolt esile kutsutud translatsiooni peatamise efektiivsus sõltub teatud rakusisestest märguannetest. Sellised märguanded võivad olla füsioloogilised nagu nt sekretsiooni-aparaadi ebapiisav aktiivsus *secM* translatsiooni peatamise puhul (Oliver *et al.*, 1998; Nakatogawa *et al.*, 2004) või spetsiifiline seostumine rakumembraaniga *mifM* translatsiooni peatamise puhul (Chiba *et al.*, 2009). Rakusiseseks märguandeks võib olla ka väikese molekulmassiga kofaktori - efektormolekuli - seondumine selleks, et moodustuks stabiilne peatatud ribosoomi kompleks (palju uuritud näide on *tnaC* translatsiooni peatamine, mis sõltub trüptofaani seondumisest) (Cruz-Vera *et al.*, 2007;). Resistentsusgeeni *ermC* ekspressiooni reguleeriva *ermCL* translatsiooni puhul on ribosoomi peatamiseks vajalik erütromütsiini seondumine (Weisblum *et al.*, 1971).

1.7 Resistentsusmehhanismid

1.7.1 Resistentsus MLS_B grupi antibiootikumide vastu

Antibiootikumiresistentsus on bakteri omadus mitte alluda antibiootikumi toimele.

Tervishoius on suur probleem bakterite resistentsus mitme antibiootikumi vastu.

Oma seondumiskoha, toime ja sarnase mõjuspektri alusel liigitatakse makroliidid samasse MLS_B antibiootikumide klastrisse linkosamiidide ja streptogramiin B-ga, kuigi struktuurilt on antibiootikumid neis kolmes grupis erinevad (Roberts, 1996). Makroliidide (ja samamoodi teiste MLS_B grupi antibiootikumide) vastu kasutavad bakterirakud põhiliselt kolme resistentsusmehhanismi: antibiootikumi seondumissaidi modifikatsioon, antibiootikumide väljapumpamine ja antibiootikumide keemiline inaktiveerimine.

Varsti peale erütromütsiini kasutuselevõttu 1950-datel, avastati selle vastu resistentsed bakteritüved. Sellest ajast alates on kirjeldatud hulgaliselt patogeene, mis on MLS_B antibiootikumide vastu resistentsuse saanud tänu erinevatele resistentsusgeenidele. Praegu on teada 77 MLS_B resistentsusgeeni (Roberts *et al.*, 2012). Sellisteks geenideks on muuhulgas rRNA metülaasid, mis metüleerivad adenini(de) jääke antibiootikumi seondumissaidis, ABC transporterid ja MFS väljavooluvalgud ning antibiootikume inaktiveerivad esteraasid, lüaasid, fosforülaasid ja transferaasid (Lisa 1). Üks levinumaid MLS_B resistentsuse mehhanisme on ribonukleotiidide modifitseerimine makroliidi seondumissaidis ribosoomis spetsiifiliste Erm-tüüpi metüültransferaaside poolt (van Hoek *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2012).

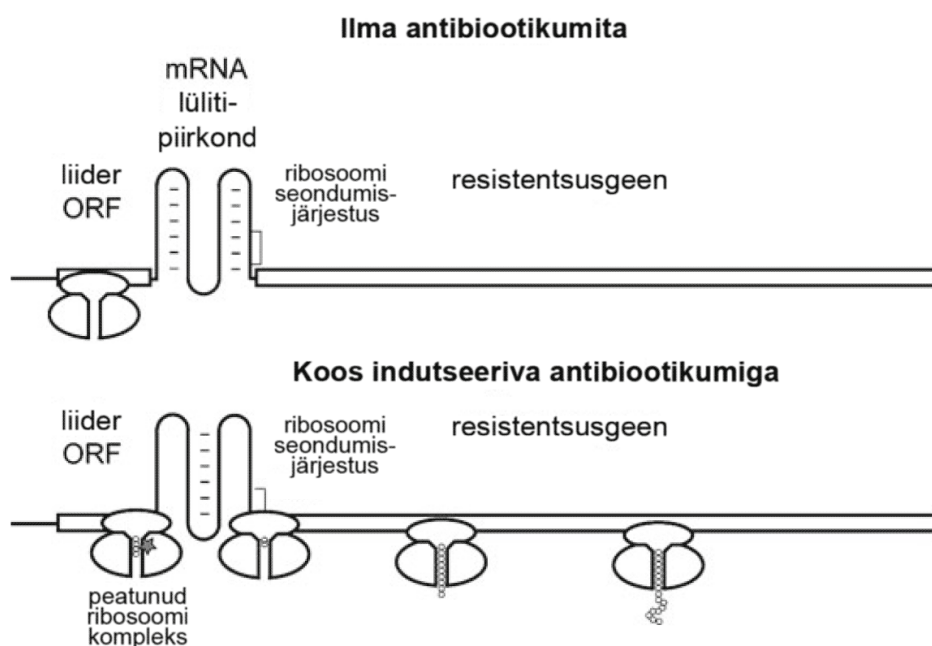
Lisaks ka mutatsioonid ribosoomi valkudes L4 ja L22 ning rRNA-s muudavad ravimi seondumissaiti, põhjustades seeläbi resistentsust. Tihti peale on mutatsioonid ribosoomi aktiivsaidis ja selle ümbruses kahjulikud, kuna langetavad ribosoomi aktiivsust. (Chittum and Champney, 1994; Weisblum, 1995 ;Vester & Douthwaite, 2001).

1.7.2 Makroliidide resistentsusgeenide ekspressiooni üldpõhimõtted

Makroliidide vastaste resistentsusgeenide ekspressioon võib olla konstitutiivne ehk pidev või indutseeritud ehk käivituv ainult antibiootikumi kohalolekul (Lisa 1) (Subramanian *et al.*, 2012).

Kuna resistentsuse induksioon toimub siis kui ravimi rakusisene kontsentratsioon on veel madal (10-1000 korda alla minimaalse inhibitoorse kontsentratsiooni (MIC)) (Weisblum *et al.*, 1971), suudavad ribosoomid, mis on veel antibiootikumi-vabad, tõhusalt toota resistentsust

andvaid valke. Indutseeritud resistentsusgeenide ekspressioon vajab kiiret vastusemehhanismi, mis suudaks tajuda suure tundlikkuse ja täpsusega antibiootikumi kohalolu ja seejärel aktiveerida resistentsus-ensüümi tootmise. Selle mehhanismi aluseks on ribosoomi peptiidi väljumistunneli ja spetsiifilise tekkiva peptiidi vaheliste interaktsioonide tekkimine ja signaali ülekanne peptidüültransferaasesse keskusesse, mis peatab edasise translatsiooni - translatsiooniline seisak. See võimaldab mRNA-l nn lüliti-piirkonnas konformatsiooni muuta ja vabastada resistentsus-ensüümi translatsiooni initsiatsiooniregiooni (Joonis 4).



Joonis 4. Indutseeritavate antibiootikumi resistentsus-geenide üldine regulatsiooniskeem (translatsioonilise nõrgestamise juhul). Indutseeriva antibiootikumi puudumisel transleeritakse pidevalt liider ORF-i, aga mitte resistentsusgeeni, sest viimase seondumisjärjestusele puudub mRNA sekundaar-struktuuri tõttu juurdepääs. Indutseeriva antibiootikumi juuresolekul moodustub liider ORF-i translatsioonil (ravimist ja tekkivast peptiidist sõltuvalt) peatunud ribosoomi kompleks. Ribosoomi peatumine liider ORF-l laseb mRNA lüliti-piirkonnal konformatsiooni muuta ja vabastada resistentsusgeeni (Subramanian *et al.*, 2012 järgi).

Lisaks joonisel 4 kirjeldatud translatsioonilise nõrgestamise mehhanismile on resistentsusgeenide ekspressiooni regulatsiooniks kasutusel ka transkriptsionaalne nõrgestamine, mis põhineb enneaegsel transkriptsiooni terminatsioonil. Peatunud ribosoomi kompleksi moodustumine ja mRNA lüliti-piirkonna ümberorganiseerumine hoiab transkriptsiooni terminatsiooni ära ning resistentsusgeen ekspresseeritakse (Subramanian 2012).

Uurides makroliidide poolt indutseeritud programmeeritud ribosoomi peatamist resistentsusgeenide ekspressioonil on tehtud olulisi avastusi ka eelpool mainitud ribosoomi tähtsa regulatsiooni-mehhanismi translatsioonilise seisaku kohta.

1.7.3 *erm* geenid

Erm (erythromycin ribosome methylase) geenide perekond kodeerib 23S rRNA dimetüültransferaase, mis metüleerivad adenini 23S rRNA A2058 C2 positsioonis ja seeläbi takistavad makroliidide (ja teiste MLS_B gruppi kuuluvate antibiootikumide) seondumist ribosoomiga (Weisblum, 1995).

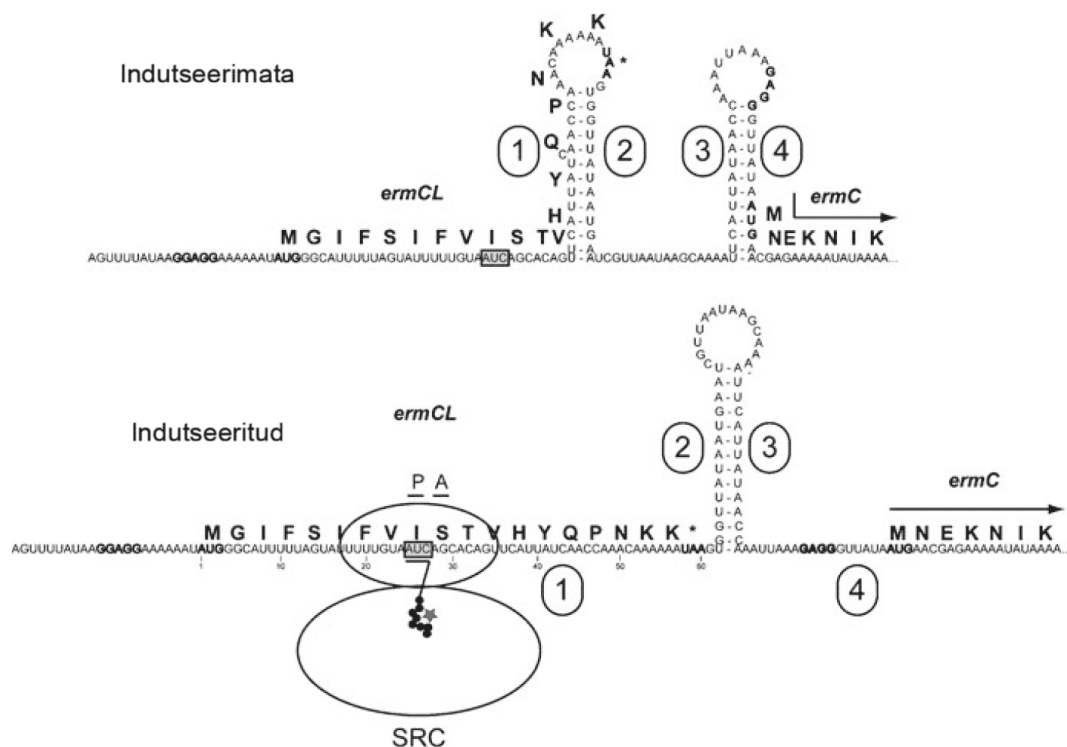
1.7.3.1 *ermC* translatsioon

Kõige paremini uuritud näide Erm-tüüpi metüültransferaasidest on ErmC. Makroliidid indutseerivad *ermC* geeni ekspressiooni *Staphylococcus aureus*es ja ka teistes bakterites. Ekspressiooni kontrollib 19 koodoni pikkune avatud lugemisraam (ORF) *ermCL*, mis asub 60 aluspaari võrra *ermC*-st ülesvoolu ja kodeerib nn liiderpeptiidi (siin ja edaspidi nimetusele lõppu lisatud L) (Gryczan *et al.*, 1980; Horinouchi & Weisblum, 1980).

Erütromütsiiniga töötlemine alla inhibeeriva taseme kutsub esile seisaku *ermCL* translatsioonil. Translatsiooni peatamine lubab mRNA-l moodustada uue konformatsiooni, mis omakorda lubab initsieerivatel ribosoomidel transleerida allavoolu asuvat *ermC* geeni, mis kodeerib antibiootikumi seondumissaiti modifitseerivat ensüümi. Sel viisil saab rakk detekteerida ohtu ja vastata antimikroobse ühendi rünnakule, tootes asjakohast resistentsust andvat valku (Gryczan *et al.*, 1980; Horinouchi & Weisblum, 1980).

Seondunud erütromütsiin peatab *ermCL* translatsioonil üheksanda koodoni juures, nii et peptidüül-tRNA^{Ile} asub P-saidis üheksa aminohappe pikkuse peptiidahelaga MGIFSIFVI (Joonis 5)(Ramu *et al.*, 2009; Vazquez-Laslop *et al.*, 2008). Mutatsioonid, mis tühistavad sellise peatamise protsessi asuvad ErmCL_{6IFVI9} järjestuses, kusjuures ei ole oluline, milline on A-saidis asuv kümnes aminohape (Ramu *et al.*, 2009; Vazquez-Laslop *et al.*, 2008). Lisaks kaotavad translatsiooni peatamise mutatsioonid 23S rRNA nukleotiidides A2062 ja A2503 ning kladinoos suhkrujäägi puudumine erütromütsiinis (Vazquez-Laslop *et al.*, 2010). See viitab komplekssele interaktsioonide võrgule ErmCL valgu, makroliidi kladinoosi suhkrujäägi ja ribosomaalse tunneli komponentide vahel. Tekkinud interaktsioonide tulemusena

saadetakse peptidüültransferaasesse tsentrisse tagasi signaali, et takistada peptiidsideme sünteesi aminohapete Ile₉ (P-saidis) ja Ser₁₀ (A-saidis) vahele (Joonis 5).



Joonis 5. *ermC* ekspressiooni kontroll. Ribosoomi seondumisjärjestused ja *ermCL* ja *ermC* initsiaator-koodonid on paksus kirjas. Indutseerimata olekus transleeritakse pidevalt *ermCL*-i, aga mitte *ermC*-d, kuna selle initsiatsiooni-sait on mRNA sekundaarstruktuuriga hõivatud. Erütromütsiini või muu indutseeriva antibiootikumi juuresolekul moodustub *ermCL* üheksanda (Ile) koodoni kohal peatunud ribosoomi kompleks (SRC) rebib lahti paar alumist aluspaari juuksenõelastruktuurist 1-2. See käivitab ümberkorralduse mRNA lüliti-piirkonnas ja moodustub indutseeritud konformatsioon, kus translatsiooni initsiatsioonil piirkond on vaba. P-saidis asuv *ermCL* koodon on kasti sees. *ermCL* koodonid 9 ja 10 asuvad vastavalt P- ja A-saidis (Subramanian *et al.*, 2012 järgi).

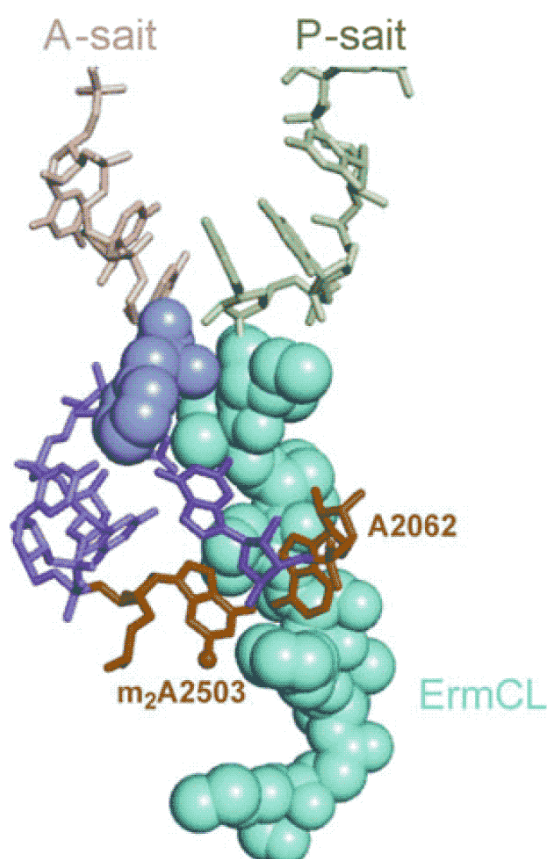
1.7.3.2 Teised *erm* geenid

Ravimist ja tekkivast peptiidist sõltuv translatsiooniline peatamine kontrollib peale *ermC* ka mitmete teiste *erm* geenide ekspressiooni (Murphy, 1985; Hue & Bechhofer, 1992; Kwon *et al.*, 2006). Arvukatest makroliidide resistentsusgeenidest on lisaks *ermC*-le vähemalt mingil määral uuritud ka induktsiooni-mehhanisme *ermA*, *ermB*, *ermD* ja *ermS* puhul (ülevaade Subramanian *et al.*, 2012). Erinevate indutseeritavate *erm* geenide ülesvoolu asuvad kontrolljärjestused on tähelepanuväärselt varieeruvad (Lisa 2)(Ramu *et al.*, 2009; Subramanian 2012). Samas on vähe uuritud nende mitmekülgsete liiderpeptiidide ribosoomi peatamise mehhanisme, näiteks ribosomaalseid elemente, mis on vajalikud erinevate *erm* geenide regulatsioonil.

1.7.3.3 Signaali ülekanne

Kuigi tänaseks on avastatud ja iseloomustatud suhteliselt vähe translatsiooni peatavaid peptiide, on siiski tõendeid selle kohta, et translatsioonilise peatamiseni viivad erinevate peatavate peptiidjärjestuste puhul erinevad allosteerilised mehhanismid (Vazquez-Laslop *et al.*, 2010).

Üks tõestust leidnud rada koosneb juba mainitud tunneli seina 23S rRNA nukleotiididest A2062-st ja A2503-st (Joonis 6). A2062 on üks kõige painduvam nukleotiididest väljumistunnelis (Fulle & Gohlke, 2009) ja mitmetes ribosomaalsetes kristallograafilistes kompleksides on nähtud teda väga erinevates konformatsioonides (Hansen *et al.*, 2002; Blaha *et al.*, 2008; Voorhees *et al.*, 2009). Kuigi vaba tunneli puhul asetub see lämmastikalus tunneli sisemuse poole, siis erütromütsiini ja tekkiva peptiidiga täidetud tunnelis asetub see lämmastikalus vastu seina, antibiootikumi siduva A2503 lähedusse. Vahemaa A2062 N7 aatomi ja A2503 tsüklilise aminogrupi vahel võib sellisel juhul olla vaid 2,8 Å, mis viitab vesiniksidemele (Ban *et al.*, 2000; Blaha *et al.*, 2008). A2503 otsesed naabernukleotiidid ulatuvad peptidüültransferaasse tsentrini. A2503 on posttranskriptsiooniliselt modifitseeritav metüültransferaasi RlmN poolt.



Joonis 6. ErmCL sensorid tekkiva peptiidi väljumistunnelis. Üheksa aminohappe pikkune ErmCL tekkiv peptiid (fMGIFSIFVI) on helesinine ja P-saiti seondunud t-RNA, mille küljes see on, roheline. A-saiti seondunud aminoatsüül-tRNA on beež ja tema aminoatsüül jääk sinine. ErmCL peptiidi sensorid, 23S rRNA nukleotiidid A2062 ja m₂A2503 on oranzid (posttranskriptsionaalselt lisatud C2-metüül grupp m₂A2503-l on märgitud kerana). A2062 ja m₂A2503 naabernukleotiidid, mis ulatuvad peptidüültransferaasse tsentri A-saiti, on lillad (Subramanian *et al.*, 2012 järgi).

Nende kahe nukleotiidi A2062 ja A2503 mutatsioonidel on sarnane mõju ribosoomi võimele reageerida teatud translatsiooni peatavatele peptiidjärjestusele. Kui mutatsioon ühes rRNA jäägis hoiab ära kindla ORF-i (*ermCL*, *ermAL1*, *secM*) puhul ribosoomi peatumise, siis sama tulem on teise jäägi mutatsioonil, samas kui translatsiooni arreteerimine pole mõjutatud ühest mutatsioonist, siis teise nukleotiidi modifikatsioon ei anna samuti muudatust (*ermBL*, *ermDL* ja *tnaC* puhul) (Vazquez-Laslop *et al.*, 2010). See näitabki nukleotiidide kasutust signaali ülekandel *ermCL*, *ermAL1* ja *secM* puhul, samas kui teistes analüüsitud ORF-ides kasutatakse mõnda muud, veel tuvastamata rada.

Mankin ja kaastöötajad uurisid edasist signaali ülekannet peptidüültransferaasse tsentri aktiiv-saidini võrreldes *ErmCL* translatsioonil toimuvat viivitamist *ErmAL1* regulaatorpetiidi omaga. *ErmAL1* järjestus ja peatamis-mehhanism on *ErmCL*-st erinevad. *ermAL1* translatsioon peatub kui kaheksas koodon (kodeerib aminohapet Val₈) asub P-saidis, kuid just A-saidis asuvast (ühesandast) aminohappe tüübist oleneb ribosoomi viivitamise efektiivsus (Ramu *et al.*, 2011). Kimäärsete *ErmCL*-*AL1* peptiididega katseid tehes tuvastati, et -2 positsioon (Phe₇ *ErmCL* ja Ala₆ *ErmAL1* puhul) reguleerib seda, kas peptidüültransferaasne tsenter on selektiivne, lubades lisada peptiidahelasse vaid valiku aminohapetest (nagu *ErmAL1* puhul) või tõkestav, hoides ära kõigi aminohapete lisandumise (nagu *ErmCL* puhul). See oluline -2 positsioon asub ribonukleotiidijääkide A2062 ja A2503 ning erütromütsiini kladinoosi-jäägi läheduses (Ramu *et al.*, 2011).

Edasi liigub signaal kas läbi A2503 naabri, peptidüültransferaasne tsenter katalüütilise tsentri nukleotiidi, G2061 ja A2451 või U2504 (*E. coli*'s posttranskriptsiooniliselt muudetud pseudouridiiniks) ja C2452 (Ramu *et al.*, 2011; Nissen *et al.*, 2000). A2451 ja C2452 moodustavad vao, kuhu asetub peptiidsideme moodustumiseks aminoatsüül-tRNA aminoatsüül-osa. Seega võib kujutada ette, kuidas väikesed muutused nende nukleotiidide asendis muudavad A-saidi vao kitsamaks (tõkestav) või laiemaks (selektiivne) (Ramu *et al.*, 2011).

2. UURIMUS

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on:

1. Anda ülevaade makroliidide seondumisest ribosoomiga.
2. Anda ülevaade makroliidide toimemehhanismidest.
3. Anda ülevaade makroliidide interaktsioonidest ribosoomi tunnelis kasvavate peptiididega.
4. Pakkuda välja uusi suundi makroliidi poolt peatatud ribosoomikomplekside uurimiseks
5. Pakkuda välja uusi suundi uute antibiootikumide väljatöötamiseks

2.2 Materjal ja metoodika

Antud töö põhineb teaduslikest artiklitest leitud andmetel. Teaduslikke artikleid valisin juhendaja soovitude ja loetud artiklites olevate viidete järgi ning otsisin lisaks võrguandmebaaside otsingutest. Kirjanduse otsimiseks kasutasin peamiselt võrguandmebaasi PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), mis võimaldab leida meditsiiniliste ja meditsiiniga seotud loodusteaduste teemadel artikleid vastavatest andmebaasidest, teadusajakirjadest ja võrgupõhistest raamatutest. Samuti kasutasin teadusartiklite otsingumootorit Google Scholar (<http://scholar.google.com/>). Otsingumootorites kasutasin vastavaid inglisekeelseid märksõnu: makroliid (*macrolide*), erütromütsiin (*erythromycin*), ribosoom (*ribosome*), kasvav peptiid (*nascent peptide*), kasvava peptiidi väljumistunnel (*nascent peptide exit tunnel*), ribosoomi peatamine (*ribosome stalling*), makroliidi resistentsus (*macrolide resistance*), *ermC* jt. Samuti otsisin artikleid huvipakkuvate autorite nimede järgi, et saada parem ülevaade nende tööst. Artiklite hulk on antud teemaga seotud meditsiini valdkonnas suur ja seetõttu tegin ka otsingumootori tulemustest isikliku valiku artiklite pealkirjades ja lühikokkuvõtetes kirjeldatud käsitluste alusel.

2.3 Tulemused. Arutelu

Makroliididega seondunud ribosoomi toimemehhanismide ja makroliidide interaktsioonide kohta on viimastel aastatel tehtud palju avastusi. Mitmetes uurimustöödes on autorite poolt pakutud välja põnevaid võimalikke uurimissuundi.

2.3.1 Peatatud ribosoomikomplekside uurimine

Kuna on väga palju ja erinevaid makroliidide resistentsusgeenide regulaatorjärjestusi, millest vaid vähesed on põhjalikumalt uuritud, siis oleks vaja nende ribosoomi-reguleerivaid molekulaarseid mehhanisme analüüsida, et saavutada parem mõistmine antibiootikumiresistentsuse induktsioonist ja ka ribosoomi töö regulatsioonist.

Mitmete resistentsusgeenide puhul on tuvastatud või kahtlustatud induktsiooni, kuid pole edasi uuritud induktsioonimehhanismi (Lisa 1) (Subramanian *et al.*, 2012). Induktsiooni molekulaarmehhanismide analüüsimiseks saab rakuvabas süsteemis moodustada mRNA – ribosoomi kompleksi, mis on makroliidide poolt peatatud. Sellistes kompleksides saab mRNA struktuuri uurida kemikaalidega sondeerides ning ribosoomi peatumiskohta määrata varbajälgede meetodil.

Mitmete resistentsusgeenidele eelnenud regulaatorjärjestusi analüüsides on avastatud sarnaseid järjestusi ja liigitatud need liiderpetiidide klassidesse. Võib eeldada, et ühte klassi kuuluvad liiderpeptiidid toimivad sarnaselt. Näiteks on on mitmest uuritud ülesvoolu ORF-st leitud ErmCL-ga väga sarnane IFVI-järjestus, kus on samuti järjestuse C-terminaalne isoleutsiin üheksa aminohappe kaugusel peptiidi N-terminusest (Lisa 2)(Ramu *et al.*, 2009; Subramanian *et al.*, 2012). See tähelepanek läks kokku eksperimentaalse mutatsioonianalüüsiga, kus lisades või eemaldades koodoneid enne ermCL peatavat IFVI-järjestust vähenes ribosoomi peatamise efektiivsus (Vazquez-Laslop *et al.*, 2008).

Paljudes regulatoorsetes ORF-des on *in vitro* biokeemilisi tehnikaid kasutades tehtud kindlaks ka täpne ribosoomi peatamise koht (Subramanian *et al.*, 2012, Ramu & Mankini avaldamata andmed) (Lisa 2). Kuna andmed resistentsusgeenide liiderpeptiidide analüüsist Subramaniani ja kaasautorite artiklist on senini avaldamata, ei saa veel täpselt kirjeldada meetodit, millega tuvastati nimetatud töös ülesvoolu regulaatorjärjestusi.

Samuti on võimalik, et mõned regulatoorsed ORF-id on veel avastamata. Seni kirjeldamata regulatoorsete järjestuste leidmiseks võiks kasutada Allase ja Tensoni poolt väljatöötatud meetodit (Allas & Tenson, 2010). Meetod põhineb β -laktamaasi geenil, millesse on lisatud ORF-i algusesse juhuslik järjestus. β -laktamaas inhibeerib teatud antibiootikumide, nagu ampitsilliini toimet. Mitme valikuringi järel leitakse järjestused, mis suruvad uuritava efektori (meie juhul makroliidi) juuresolekul β -laktamaasi geeni ekspressiooni alla.

Palju on ka resistentsusgeene, millel on ülesvoolu ORF-id, aga millel pole tuvastatud seni kirjeldatud regulaatorsete peptiididega äratuntavat homoloogiat (Lisa 2) ning millede kohta on vaja veel eksperimentaalsete katsetega teha kindlaks, kas ka need reguleerivad antibiootikumist sõltuvalt vastava resistentsusgeeni ekspressiooni, moodustades peatunud ribosoomi kompleksi.

Makroliidide vastu resistentsust loovate geenide regulaatorjärjestused on tähelepanuväärselt varieeruvad, mis viitab ka tõenäoliste mitmekülgsetele induktsioonimehhanismidele, kontaktidele ja ülekanderadadele tekkiva peptiidi väljumistunnelis ribosoomis. Nende järjestuste võrdlemisel teiste juba uuritud antibiootikumide resistentsusgeenide translatsiooni peatavate järjestustega (nagu klooramfenikooli resistentsust reguleerivad ORF-d ja mitmete antibiootikumide vastu resistentsust põhjustavat metülaasi *cfr* reguleerivad ORF-id) võiks tuvastada teatud homoloogiaid, mille funktsiooni molekulaarsete meetoditega edasi analüüsida.

Üks meetod, millega saaks uurida makroliidide poolt peatatud ribosoomikomplekse on küro-elektronmikroskoopia. Võrdluses röntgen-kristallograafiaga ei vaja see meetod biomolekuli kristalliseerimist. Meetodi eeliseks tavalise elektron-mikroskoopia ees on, et see lubab vaadelda biomolekule, mis ei ole keemiliselt või muul moel töödeldud, vaid asuvad oma loomulikus keskkonnas. See võimaldab vaadelda ka molekulaarseid masinaid, nagu ribosome, oma erinevates seisundites ja asendites. Küro-elektronmikroskoopia tehnoloogia on teinud viimastel aastatel läbi suure arengu. Kui esimestel ribosoomi ja kasvava peptiidi kujutistel ei olnud veel resolutsioon piisav, et veenvalt tuvastada teatud molekulaarseid kontakte (Seidelt *et al.*, 2009; Bhushan *et al.*, 2010), siis nüüd on seda meetodit kasutades võimalik saada varasemast täpsemad struktuurid. (Frank, 2013).

2.3.2 Uute antibiootikumide väljatöötamine

2.3.2.1 Induktsioonimehhanismide “petmine”

Antibiootikumide resistentsust indutseeriv omadus on selgelt eristatav nende üldisest translatsiooni inhibeerivast efektist (Ramu *et al.*, 2009). Antibiootikumide arendamisele mõeldes pakkusid Subramanian ja kaasautorid välja eesmärgi tuvastada (nt reporter-süsteemide abiga) inhibiitor-ühendeid, mis suudavad vältida resistentsusgeenide induktsiooni ja efektiivselt inhibeerida valgusünteesi bakterites, mis on varustatud indutseeritavate resistentsusgeenidega.

2.3.2.2 Makroliidi struktuuri olulised aspektid

Kannan, Vazquez-Laslop ja Mankin uurisid hiljutises artiklis peptiidi väljumistunnelisse kinnitunud makroliidi translatsiooni blokeerivat omadust ja näitasid, et makroliidide mõju ei hõlma kõiki valke, nagu varem oli arvatud, vaid on ka võimalik valgu-spetsiifiline läbipääs (Kannan *et al.*, 2012). Varasemad ribosoomi kristallograafilised uurimused olid näidanud, et tekkiva peptiidi jaoks võiks olla peptiidi väljumistunnelis piisavalt ruumi ka siis kui sinna on seondunud mõni makroliid (Bulkley *et al.*, 2010; Dunkle *et al.*, 2010; Schlünzen *et al.*, 2001; Tu *et al.*, 2005). Kannan ja kaasautorid jälgisid erütromütsiini ja telitromütsiini töötlust järgselt ³⁵S-metioniini lisamist *E. coli* valkudesse. Isegi peale 100-kordset MIC ületamist erütromütsiini puhul, jätkus valgusüntees 6% normaaltasemest ja üllatavalt lubas telitromütsiini valgusünteesi isegi 25% normaaltasemest. Kahedimensionaalne geel-elektroforees näitas, et mitmete valkude sünteesi olemasolev ravimist, mida kasutati, mis viitab sellele, et makroliidi keemiline struktuur määrab ära sünteesitud valkude spektri (Kannan *et al.*, 2012). Uue avastuse valguses pakuti välja, et ketoliidide parema efektiivsuse taga võib olla hoopis asjaolu, et nad lasevad ka kõrge ravimi kontsentratsiooni korral rohkem valke läbi väljumistunneli ja sellega viivad bakteriraku proteoomi tasakaalust välja. Samas kui kõigi valkude sünteesi takistamine viib rakud bakteriostaasi, siis ainult osade valkude translatsioon häirib biokeemilisi radasid erinevates etappides ja võib viia metaboolsete intermediaatide akumulatsioonini ja tähtsate kofaktorite ammendumiseni, mis võib käivitada letaalse rakulise vastuse (Kohanski *et al.*, 2007). Uute antibiootikumide väljatöötamisel võib seda omadust ära kasutades optimiseerida ribosoomi väljumistunnelisse kinnituva ravimi teatud molekulide takistamisele ja seeläbi tõsta bakteritsiidsust.

Samas näitas ka erinev valgusüntees ketoliidide ja kladinoosi kõrvalahelaga makroliidide puhul seda, et ribosoomi peptiide jälgivad omadused sõltuvad tunnelisse seondunud madalmolekulaarsetest efektoritest. Kannani ja kaasautorite poolt tõsteti seda tähelepanekut esile, kuna selliste väiksete molekulide tuvastamine, mis kinnituvad peptiidi väljumistunnelisse muudavad teatud kindlate valkude sünteesi eukarüootses rakus, võiks leida laialdast kasutust meditsiinis (Peltz *et al.*, 2009; Kannan *et al.*, 2012).

2.3.2.3 Liigispetsiifiline suund

Ribosoomide struktuur, nagu ka tekkiva peptiidi väljumistunnel, on eri liikidel erinev. Tõenäoliselt on sellest tulenevalt erinev ka valkude spekter, mis suudavad makroliidi poolt blokeeritud tunnelist läbi minna, nagu selgus Gram-negatiivse *E. coli* ja Gram-positiivse bakteri *Staphylococcus aureus* võrdluses (Kannan *et al.*, 2012). Makroliidide inhibitsioonist pääsevate valkude kompleks tõenäoliselt mõjutab rakkude kasvu ja elutegevust. Seega makroliidi seondumissaidi läheduses asuva ribosomaalse tunneli struktuuri variatsioon võib olla üks olulistest põhjustest, miks erinevates bakteriliikides on ühel kindlal makroliidil erinev efekt.

Kannan ja Mankin andsid varasemas 2011. aasta artiklis ülevaate, kuidas liikidevahelised ribosomaalsed erinevused põhjustavad teadaolevalt makroliidide erinevat seondumist ja toimet. Kuni praeguse ajani on enamus teavet ribosoomi ja makroliidi seoste kohta saadud mudelorganismidest, mis aga võivad olla oluliselt erinevad levinud patogeenidest. Selliste uute antibiootikumide arendamine, mis lähtub struktuurist, peaks arvesse võtma liikidevahelist erinevust ribosoomi struktuuris ja võimalikke erinevusi patogeensete liikide ravimi seondumiskohas ribosoomis. Struktuuril baseeruva ravimidisaini suunas tehakse praegu veel esimesi ponnistusi (Franceschi & Duffy, 2006; Kannan & Mankin, 2011). Sellel teel on peamiseks takistuseks eri liikide ribosoomi kristallstruktuuride mittekättesaadavus, kuna pole suudetud kliiniliselt oluliste patogeenide ribosoomi kristalliseerida. Arengud küroelektronmikroskoopias lubavad loota, et ka erinevate patogeenide ribosomaalsed erinevused saavad paremini kaardistatud (Frank, 2013).

Laiahaardelisem info ribosoomide struktuursete erinevuste kohta võiks kiirendada uute antibiootikumide disaini ja/või pakkuda uudset kasutust teadaolevatele ravimitele.

2.3.3 Lõpetuseks

Ribosoomi ja antibiootikumide toimemehhanismidega seotud valdkond on põnev ja oluline ning pidevas arengus. Teadmised makroliidide ja peatatud ribosoomikomplekside kohta lähiajal kindlasti täienevad ja loodetavasti viib see ka uute antibiootikumide kiire väljatöötamiseni.

KOKKUVÕTE

Makroliidid on kliiniliselt olulised antibiootikumid ning üha laialdasema ravimiresistentsuse leevendamiseks on tähtis makroliidide toimemehhanismide ja nende vastu tekkinud resistentsusmehhanismide parem mõistmine.

Käesoleva bakalaureuseõõ üheks eesmärgiks oli anda ülevaade makroliidide ribosoomiga seondumisest, toimest ja interaktsioonidest ribosoomi tunnelis kasvava peptiidiga. Samuti pakkuda välja suundi peatunud ribosoomikompleksi uurimiseks ning uute antibiootikumide väljatöötamiseks. Kirjanduse ülevaade ka makroliidide resistentsusgeenide ja täpsemini *ermC* ekspressiooni mehhanisme.

Makroliidide poolt indutseeritavate ja spetsiifiliste kasvavate peptiidide poolt reguleeritavate resistentsusmehhanismide kohta vajavad mitmed üksikasjad põhjalikumat uurimist, näiteks ribosoomi peatavad järjestused, mRNA konfirmatsiooni muutused ja signaaliülekande rajad ribosoomi väljumistunnelis. Edasisteks uurimistöödeks on pakutud välja meetodeid induktsioonimehhanismi analüüsiks.

Uute teadmiste saamiseks võiks seda infot, mis meil on makroliididega seotud protsessidest bakterirakus, sünteesida andmetega, mis meil on teistest regultoorsetest kasvava peptiidijärjestustest bakterirakus.

Ribosoomi translatsioonilise peatamise kohta võiksid anda uut infot ka tehnoloogiliselt täiendatud kristallograafilised või küro-elektronmikroskoopilised uuringud.

Makroliidide resistentsusgeenide ekspressiooni kontrollivate molekulaarmehhanismide mõistmine võib aidata kasutada olemasolevaid makroliide paremini ja pakkuda suundi selliste antibiootikumide arendamiseks, mis ei indutseeri resistentsuse avaldumist.

Analüüsides kirjanduses välja pakutud uurimissuundi, millede kaugemaks sihiks on tuleviku-antibiootikumide väljatöötamine, äratas tähelepanu avastus, et on selliseid spetsiifilisi peptiide, mis suudavad antibiootikumiga „kinnikorgitud“ ribosoomi tunneliavast läbi põigelda. Sellise valikulise sünteesi tulemuseks on drastilised muutused proteoomis, mis võivad olla bakterile isegi letaalsemad kui kõigi valkude sünteesi seiskumine. Sellistes tingimustes sünteesitud valkude spekter sõltub nii antibiootikumi struktuurist kui ribosoomi väljumistunneli struktuurist – sellest tulenevalt peeti oluliseks nii antibiootikumi modifitseerimist kui patogeeni-spetsiifilist ribosoomide struktuuranalüüsi.

Macrolide interactions with nascent peptide in ribosome exit tunnel

Telin Noorväli

SUMMARY

Macrolides are clinically important antibiotics. Commonly accepted model of macrolide action considers them to block protein synthesis by binding to the ribosomal tunnel and obstructing the growth of the nascent peptide chain. Some macrolides with longer side-chains can reach to the peptidyl transferase centre and interfere with peptide-bond formation.

Certain nascent peptides are able to stall translating ribosome. This kind of nascent peptide regulated ribosome stalling is an important mechanism of protein expression regulation and protein targeting and folding. Recently special nascent peptides, that can slither through the macrolide-obstructed exit tunnel, have been described. Also is new knowledge that some of these peptides can be arrested at later stages of translation.

The expression of many widely spread macrolide resistance genes are repressed when there are no macrolides and activated in their presence. The inducible expression of resistance genes is regulated by upstream regulatory ORF's with ribosome stalling properties.

The aim of this work is to give an overview of the macrolide binding, action and interactions with nascent peptide in ribosome exit tunnel. I also aim to give insight into potential directions of research on stalled ribosome-macrolide complexes and development of new macrolide antibiotics.

The research on ribosome complexes bound with macrolide could benefit from comparing data we have about inducible resistance genes, ribosome late arrest or other processes involving stalling regulatory peptides. Also improvements in technology in cryo-electromicroscopy could result with more precise structural insights on ribosome-macrolide-nascent peptide complex.

Better understanding of inducible expression of macrolide resistance genes could result in development of new antibiotics, that do not induce resistance. The development of new antibiotics could also benefit from discovery of selective protein synthesis with the drug-obstructed exit tunnel. Spectra of synthesized proteins depend on structure of antibiotic and species-specific differences in ribosome exit tunnel. It was proposed that drugs that let through specific proteins could be more bacteriocidal and clinically more effective. Receiving crystallography/cryo-electronmicroscopy structures of pathogenic ribosomes could trigger development of species-specific antibiotics.

TÄNUAVALDUSED

Kõigepealt sooviksin tänada oma juhendajat Tanel Tensonit, juhendamise ja abi eest.
Suured tänud ka Hannes Luidalepale ja Kristi Leedjärvele asjakohaste soovitude eest.
Südamest tänud perekonnale toetuse eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

Ackermann, G. & Rodloff, A.C. 2003. Drugs of the 21st century: telithromycin (HMR 3647) - the first ketolide. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 497–511

Allas, Ü & Tenson, T. 2010. A method for selecting cis-acting regulatory sequences that respond to small molecule effectors. *BMC Mol. Bio.* 11: 56

Andersson, S. & C.G. Kurland. 1987. Elongating ribosomes in vivo are refractory to erythromycin. *Biochimie.* 69: 901– 904

Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, *et al.*. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science.* 289: 905–920

Bhushan, S., H. Meyer, A.L. Starosta, T. Becker, T. Mielke, *et al.* 2010. Structural basis for translational stalling by human cytomegalovirus and fungal arginine attenuator peptide. *Mol Cell* 40: 138–146

Blaha, G., Gurel, G., Schroeder, S.J., Moore, P.B., Steitz, T.A. 2008. Mutations outside the anisomycin-binding site can make ribosomes drug-resistant. *J Mol Biol.* 379: 505–519

Blondeau, J., DeCarolus, E., Metzler, K., Hansen, G. 2002. The macrolides. *Expert Opin. Invest. Drugs* 11: 189–215.

Bogdanov, A.A., N.V. Sumbatyan, A.V. Shishkina, V.V. Karpenko, G.A. Korshunova. 2010. Ribosomal Tunnel and Translation Regulation. *Biochemistry (Mosc).* 75: 1501–1516.

Bulkley, D., C.A. Innis, G. Blaha & T.A. Steitz. 2010. Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 17158–17163.

Champney, W.S. & M. Miller. 2002. Inhibition of 50S ribosomal subunit assembly in *Haemophilus influenzae* cells by azithromycin and erythromycin. *Curr. Microbiol.* 44: 418–424.

- Chiba, S., Lamsa, A., Pogliano, K. 2009. A ribosome nascent chain sensor of membrane protein biogenesis in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 28: 3461–3475.
- Chittum, H., Champney, W. 1994. Ribosomal protein gene sequence changes in erythromycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 176: 6192–6198
- Chow, C.S., Lamichhane, T.N., Mahto, S.K. 2007. Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with post-transcriptional modifications. *Chem Biol.* 2: 610–619
- Cocito, C., Di Giambattista, M., Nyssen, E. & Vannuffel, P. 1997. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 7–13.
- Cruz-Vera, L.R., Rajagopal, S., Squires, C., Yanofsky, C. 2005. Features of ribosome-peptidyltRNA interactions essential for tryptophan induction of *tna* operon expression. *Mol Cell* 19: 333–343
- Cruz-Vera, L.R., A. New, C. Squires, C. Yanofsky. 2007. Ribosomal features essential for *tna* operon induction: Tryptophan binding at the peptidyl transferase center. *J Bacteriol.* 189: 3140–3146
- Douthwaite, S. 1992. Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23 S ribosomal RNA. *Nucl. Acids Res.* 20: 4717– 4720.
- Dunkle, J.A., L. Xiong, A.S. Mankin & J.H. Cate. 2010. Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 17152–17157.
- Franceschi, F. & E.M. Duffy. 2006. Structure-based drug design meets the ribosome. *Biochem. Pharmacol.* 71: 1016–1025.
- Frank, J. 2013. Story in a sample - the potential (and limitations) of cryo-electron microscopy applied to molecular machines. *Biopolymers*. [Epub ahead of print]

- Fulle, S. & Gohlke, H. 2009. Statics of the ribosomal exit tunnel: implications for cotranslational peptide folding, elongation regulation, and antibiotics binding. *J Mol Biol* 387: 502–517.
- Gamerding, M. & Deuerling, E. 2012. Macrolides: the plug is out. *Cell*. 151:469-471
- Gryczan, T.J., Grandi, G., Hahn, J., Grandi, R., and Dubnau, D. 1980. Conformational alteration of mRNA structure and the posttranscriptional regulation of erythromycin-induced drug resistance. *Nucleic Acids Res.* 8: 6081–6097
- Hamilton-Miller, J.M., and Shah, S. 1998. Comparative in-vitro activity of ketolide HMR 3647 and four macrolides against gram-positive cocci of known erythromycin susceptibility status. *J. Antimicrob. Chemother.* 41: 649–653.
- Hansen, J.L., J.A. Ippolito, N. Ban, *et al.*. 2002. The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell* 10: 117–128.
- van Hoek A. H. A. M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. P., Aarts H. J. M. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbio.* 2: 203.
- Horinouchi, S., and Weisblum, B. 1980. Posttranscriptional modification of mRNA conformation: mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7079–7083
- Hue, K.K., D.H. Bechhofer. 1992. Regulation of the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *ermD*. *J Bacteriol* 174: 5860–5868.
- Ito, K., Chiba, S., and Pogliano, K. 2010. Divergent stalling sequences sense and control cellular physiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393: 1–5.
- Jenni, S. & N. Ban. 2003. The chemistry of protein synthesis and voyage through the ribosomal tunnel. *Curr Opin Struct Biol* 13: 212–219.
- Kannan, K., N. Vazquez-Laslop & A.S. Mankin. 2012. Selective protein synthesis by ribosomes with a drug-obstructed exit tunnel. *Cell* 151: 508-520

- Kannan, K. & Mankin, A.S. 2011. Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. *Ann N Y Acad Sci.*1241:33–47
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A., and Collins, J.J. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130: 797–810.
- Kwon, A.R., Y.H. Min, E.J. Yoon, J.A. Kim, M.J. Shim, E.C. Choi. 2006. ErmK leader peptide: amino acid sequence critical for induction by erythromycin. *Arch Pharm Res* 29: 1154–1157.
- Lawrence, M., L. Lindahl, J.M. Zengel. 2008. Effects on translation pausing of alterations in protein and RNA components of the ribosome exit tunnel. *J Bacteriol* 190: 5862–5869
- Liu, M. & S. Douthwaite. 2002. Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14658–14663.
- Llano-Sotelo, B., J. Dunkle, D. Klepacki, *et al.*. 2010. Binding and action of CEM-101, a new fluoroketolide antibiotic that inhibits protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4961–4970.
- Lovmar, M., T. Tenson & M. Ehrenberg. 2004. Kinetics of macrolide action: the josamycin and erythromycin cases. *J. Biol. Chem.* 279: 53506–53515.
- Lovmar, M., K. Nilsson, V. Vimberg, *et al.*. 2006. The molecular mechanism of peptide-mediated erythromycin resistance. *J. Biol. Chem.* 281: 6742–6750.
- Lovmar, M., K. Nilsson, E. Lukk, *et al.*. 2009. Erythromycin resistance by L4/L22 mutations and resistance masking by drug efflux pump deficiency. *EMBO J.* 28: 736–744.
- Mao, J. C.-H. & Robishaw, E. E. 1972. Erythromycin, a peptidyltransferase effector. *Biochemistry.* 11: 4864– 4872.

- McGuire, J.M., R.L. Bunch, R.C. Anderson, *et al.*. 1952. Ilotycin, a new antibiotic. Schweiz Med.Wochenschr. 82: 1064– 1065.
- Menninger, J. R. & Otto, D. P. 1982. Erythromycin, carbomycin and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 810–818.
- Milligan, R. A. & Unwin, P. N. 1986. Location of exit channel for nascent protein in 80 S ribosome. Nature. 319: 693– 695.
- Moore P.B. & Steitz T.A. 2003. The structural basis of large ribosomal subunit function. Annu Rev of Biochem. 72: 813–850.
- Moore, S.D. & R.T. Sauer. 2008. Revisiting the mechanism of macrolide-antibiotic resistance mediated by ribosomal protein L22. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 18261–18266.
- Murphy, E. 1985. Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 162: 633–640.
- Nakatogawa, H., Ito, K. 2002. The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate. Cell 108: 629–636.
- Nakatogawa, H., Murakami, A. Ito, K. 2004. Control of SecA and SecM translation by protein secretion. Curr Opin Microbiol. 7: 145–150
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. Science. 289: 920– 930.
- Oliver, D., Norman, J., Sarker, S. 1998. Regulation of *Escherichia coli* *secA* by cellular protein secretion proficiency requires an intact gene X signal sequence and an active translocon. J Bacteriol 180: 5240–5242.
- Otaka, T. & Kaji, A. 1975. Release of (oligo) peptidyl-tRNA from ribosomes by erythromycin A. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 72: 2649– 2652.

- Peltz, S.W., E.M. Welch, C.R. Trotta, T. Davis, A. Jacobson. 2009. Targeting post-transcriptional control for drug discovery. *RNA Biol.* 6: 329–334.
- Poulsen, S. M., Kofoed, C. & Vester, B. 2000. Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin. *J. Mol. Biol.* 304: 471– 481
- Putnam, S.D., M. Castanheira, G.J. Moet, *et al.*. 2010. CEM-101, a novel fluoroketolide: antimicrobial activity against a diverse collection of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 66: 393–401.
- Pyetan, E., D. Baram, T. Auerbach-Nevo, A. Yonath. 2007. Chemical parameters influencing fine-tuning in the binding of macrolide antibiotics to the ribosomal tunnel. *Pure Appl. Chem.* 79: 955–968.
- Ramu H., A.S. Mankin, N. Vazquez-Laslop. 2009. Programmed drug-dependent ribosome stalling. *Mol Microbiol* 71: 811–824.
- Ramu H., Vázquez-Laslop N., Klepacki D., Dai Q., Piccirilli J., Micura R., Mankin A.S. 2011. Nascent peptide in the ribosome exit tunnel affects functional properties of the A-site of the peptidyl transferase center. *Mol. Cell* 41: 321–330.
- Roberts M. C. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 1–24.
- Roberts M.C., Schwarz S., Aarts H.J. 2012. Erratum: Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol.* 3:384
- Schlünzen, F., Harms, J. M., Franceschi, F., Hansen, H. A., Bartels, H., Zarivach, R. & Yonath, A. 2003. Structural basis for the antibiotic activity of ketolides and azalides. *Structure*, 11: 329– 338.
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R. *et al.*. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 413: 814– 821.

- Seidelt B., *et al.*. 2009. Structural insight into nascent polypeptide chain-mediated translational stalling. *Science* 326:1412–1415.
- Siibak, T., L. Peil, L. Xiong, *et al.*. 2009. Erythromycin- and chloramphenicol-induced ribosomal assembly defects are secondary effects of protein synthesis inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 563–571.
- Starosta, A.L., V.V. Karpenko, A.V. Shishkina, *et al.*. 2010. Interplay between the ribosomal tunnel, nascent chain, and macrolides influences drug inhibition. *Chem. Biol.* 17: 504–514.
- Subramanian, S.L., Ramu, H., Mankin, A.S. 2012. Inducible Resistance to Macrolide Antibiotics, p. 455-484. T. J. Dougherty, M. J. Pucci, *Antibiotic Discovery and Development*, 1. Springer, New York
- Tenson, T., L. Xiong, P. Kloss & A.S. Mankin. 1997. Erythromycin resistance peptides selected from random peptide libraries. *J. Biol. Chem.* 272: 17425–17430.
- Tenson, T. & Ehrenberg, M. 2002. Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel. *Cell*, 108: 591–594.
- Tenson, T., M. Lovmar & M. Ehrenberg. 2003. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J. Mol. Biol.* 330: 1005–1014.
- Thompson, J., C.A. Pratt & A.E. Dahlberg. 2004. Effects of a number of classes of 50S inhibitors on stop codon readthrough during protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 4889–4891.
- Tripathi, S., P.S. Kloss & A.S. Mankin. 1998. Ketolide resistance conferred by short peptides. *J. Biol. Chem.* 273: 20073-20077.
- Tu, D., Blaha, G., Moore, P.B. and Steitz, T.A. 2005. Structures of MLS_BK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell* 121: 257–270.

Vazquez-Laslop, N., C. Thum, A.S. Mankin. 2008. Molecular mechanism of drug dependent ribosome stalling. *Mol Cell* 30:190–202.

Vazquez-Laslop, N., Ramu, H., Klepacki, D., Kannan, K., Mankin, A.S. 2010. The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide. *EMBO J.* 29: 3108–3117

Vazquez-Laslop, N., D. Klepacki, D.C. Mulhearn, *et al.*. 2011. Role of antibiotic ligand in nascent peptide-dependent ribosome stalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 10496–10501

Vester, B. & R.A. Garrett. 1987. A plasmid-coded and sitedirected mutation in *Escherichia coli* 23S RNA that confers resistance to erythromycin: implications for the mechanism of action of erythromycin. *Biochimie* 69: 891–900.

Vester, B., Douthwaite, S. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:1–12.

Voorhees, R.M., Weixlbaumer, A., Loakes, D., Kelley, A.C., Ramakrishnan, V. 2009. Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 16: 528–533.

Voss, N.R., Gerstein, M., Steitz, T.A., Moore, P.B. 2006. The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel. *J. Mol. Biol.* 360: 893–906.

Weisblum, B., C. Siddhikol, C.J. Lai, V. Demohn. 1971. Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus* : requirements for induction. *J Bacteriol* 106:835–847

Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 577–585.

Wilson, D.N., G. Blaha, S.R. Connell, P.V. Ivanov, H. Jenke, U. Stelzl, Y. Teraoka, K.H. Nierhaus. 2002. Protein synthesis at atomic resolution: mechanistics of translation in the light of highly resolved structures for the ribosome. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 1–53.

Wilson D.N. & Nierhaus K.H. 2003. The ribosome through the looking glass. *Angew. Chem., Int. Ed.* 42: 3464-3486

Yonath, A., Leonard, K. R. & Wittmann, H. G. 1986. A tunnel in the large ribosomal subunit revealed by three-dimensional image reconstruction. *Science*. 236: 813–816.

Zhong, P. & Shortridge, V. 2001. The emerging new generation of antibiotic: ketolides. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 1: 125– 131.

Ōmura, S. 2002. *Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice*, 2nd Edition. Elsevier Science.

Lisa 1.

Tabel 1 MLSB resistentsusgeenide toimeviis ja indutseeritavus. (Subramanian et al., 2012)

| Geeni nimi | Resistentsusmehhanism | Organism | Resistentsus- profiil ^a | Indutseeritavus | GenBank | Pubmed ID |
|-------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|----------|-----------|
| <i>ermA</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Staphylococcus aureus</i> | MLS _B | Indutseeritav | X03216 | 3004956 |
| <i>ermA</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Streptococcus pyogenes</i> | MLS _B | Indutseeritav | AF002716 | 9527769 |
| <i>ermB</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Escherichia coli</i> | MLS _B | Konstitutiivne | M19270 | 2832378 |
| <i>ermB</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Streptococcus sanguinis</i> | MLS _B | Indutseeritav | K00551 | 6406429 |
| <i>ermB</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Enterococcus faecalis</i> | MLS _B | Indutseeritav | M11180 | 2997130 |
| <i>ermB</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Lactobacillus reuteri</i> | MLS _B | Teadmata | AF080450 | 10413663 |
| <i>ermB</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Staphylococcus intermedius</i> | MLS _B | Indutseeritav ^b | AF299292 | 11230937 |
| <i>ermB</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Enterococcus faecalis</i> | MLS _B | Indutseeritav | U86375 | 9791136 |
| <i>ermC</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Staphylococcus simulans</i> | MLS _B | Konstitutiivne | AF019140 | 9742700 |
| <i>ermC</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Staphylococcus aureus</i> | MLS _B | Indutseeritav | V01278 | 6279574 |
| <i>ermD</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Bacillus licheniformis</i> | MLS _B | Indutseeritav | M77505 | 1713206 |
| <i>ermD</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Bacillus anthracis</i> | MLS _B | Indutseeritav | L08389 | 8473865 |
| <i>ermD</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Bacillus licheniformis</i> | MLS _B | Indutseeritav | M29832 | 6429477 |
| <i>ermE</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Saccharopolyspora erythraea</i> | MLS _B | Teadmata | M11200 | 3934045 |
| | | | | | | 2998943 |
| <i>ermF</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Bacteroides fragilis</i> | MLS _B | Teadmata | M17808 | 2820936 |
| <i>ermF</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Bacteroides fragilis</i> | MLS _B | Teadmata | M62487 | 1905805 |
| <i>ermG</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Lysinibacillus sphaericus</i> | MLS _B | Indutseeritav | M15332 | 3025178 |
| <i>ermG</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | MLS _B | Teadmata ^c | L42817 | 8834912 |
| <i>ermH</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Streptomyces thermotolerans</i> | MLS _B | Indutseeritav | M16503 | 3036668 |
| <i>ermN</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Streptomyces fradiae</i> | MLS _B | Konstitutiivne | X97721 | 8973363 |
| | | | | | | 1995426 |
| <i>ermO</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Streptomyces ambofaciens</i> | MLS _B | Teadmata | AJ223970 | 10517588 |
| <i>ermQ</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Clostridium perfringens</i> | MLS _B | Teadmata | L22689 | 8067735 |
| <i>ermR</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Arthrobacter</i> sp. | M | Teadmata | M11276 | 4043733 |
| <i>ermS</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Streptomyces fradiae</i> | MLS _B | Indutseeritav | M19269 | 3127381 |

Tabel 1 (jätkub)

| Geeni nimi | Resistentsusmehhanism | Organism | Resistentsus- profil ^a | Indutseeritavus | GenBank | Pubmed ID |
|--------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|----------|----------------------|
| <i>ermT</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Lactobacillus reuteri</i> | MLS _B | Konstitutiivne | M64090 | 8171126 |
| <i>ermT</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Lactobacillus fermentum</i> | MLS _B | Konstitutiivne | AJ488494 | 14597008 |
| <i>ermV</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> | MLS _B | Indutseeriv | U59450 | 6163765 9055987 |
| <i>ermW</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Micromonospora griseorubida</i> | MLS _B | Teadmata | D14532 | 8163173 |
| <i>ermX</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | MLS _B | Indutseeriv | M36726 | 11408212 |
| <i>ermY</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Staphylococcus aureus</i> | MLS _B | Indutseeriv | AB014481 | 11751136 |
| <i>erm30</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Streptomyces venezuelae</i> | Teadmata | Teadmata | AF079138 | 9770448 |
| <i>erm31</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Streptomyces venezuelae</i> | Teadmata | Teadmata | AF079138 | 9770448 |
| <i>erm32</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Streptomyces fradiae</i> | M | Indutseeriv | AJ009971 | 10348045 |
| <i>erm33</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Staphylococcus sciuri</i> | MLS _B | Indutseeriv | AJ313523 | 12384375 |
| <i>erm34</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Bacillus clausii</i> | MLS _B | Teadmata | AY234334 | 14711653 |
| <i>erm35</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Bacteroides coprosuis</i> | MLS _B | Teadmata | AF319779 | – |
| <i>erm36</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Micrococcus luteus</i> | MLS _B | Indutseeriv | AF462611 | 12177341 |
| <i>erm37</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | MLS _B | Indutseeriv | Z74025 | 9634230 |
| | | | | | BX842578 | 16174779 |
| <i>erm38</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Mycobacterium smegmatis</i> | ML | Indutseeriv | AY154657 | 14506008 |
| | | | | | CP000480 | 16127056 |
| <i>erm39</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Mycobacterium fortuitum</i> | ML | Indutseeriv | AY487229 | 15590712 |
| <i>erm40</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Mycobacterium mageritense</i> | ML | Konstitutiivne | AY570506 | 17005837 |
| <i>erm41</i> | Seondumiskoha modifikatsioon | <i>Mycobacterium abscessus</i> | ML | Indutseeriv | EU177504 | 19171799 |
| <i>msrA</i> | Väljavool | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | MS _B | Indutseeriv | X52085 | 2233255 |
| <i>msrC</i> | Väljavool | <i>Enterococcus faecium</i> | MS _B | Indutseeriv | AY004350 | 11120975 |
| <i>msrD</i> | Väljavool | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | M | Indutseeriv | AF274302 | 11398110 16223938 |
| <i>oleB</i> | Väljavool | <i>Streptomyces antibioticus</i> | Oleandomycin | Teadmata | L36601 | 7565095 |
| <i>oleC</i> | Väljavool | <i>Streptomyces antibioticus</i> | Oleandomycin | Teadmata | L06249 | 8326867 |
| <i>srnB</i> | Väljavool | <i>Streptomyces ambofaciens</i> | Spiramycin | Indutseeriv | X63451 | 1508047 |
| <i>tlrC</i> | Väljavool | <i>Streptomyces fradiae</i> | Tylosin | Indutseeriv | M57437 | 1864505 |

Tabel 1 (jätkub)

| Geeni nimi | Resistentsusmehhanism | Organism | Resistentsus- profiil ^a | Indutseeritavus | GenBank | Pubmed ID |
|-------------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------------|-----------------|------------|---------------------|
| <i>mefA</i> | Väljavool | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | ML | Teadmata | AF274302 | 11398110 |
| <i>mefB</i> | Väljavool | <i>Escherichia coli</i> | ML | Teadmata | FJ196385 | 19131424 |
| <i>ereA</i> | Ravimi modifikatsioon | <i>Providencia stuartii</i> | M | Teadmata | AF099140 | 12654734 |
| <i>ereA</i> | Ravimi modifikatsioon | <i>Escherichia coli</i> | M | Konstitutiivne | AY183453 | 14506050 |
| <i>ereA</i> | Ravimi modifikatsioon | <i>Vibrio cholerae</i> | M | Teadmata | AF512546 | 12183252 |
| <i>ereB</i> | Ravimi modifikatsioon | <i>Escherichia coli</i> | M | Konstitutiivne | X03988 | 3523438 |
| <i>ereB</i> | Ravimi modifikatsioon | <i>Escherichia coli</i> | M | Konstitutiivne | AB207867.1 | 2546492 |
| <i>ereB</i> | Ravimi modifikatsioon | <i>Escherichia coli</i> | M | Teadmata | A15097 | – |
| <i>mphA</i> | Ravimi modifikatsioon | <i>Escherichia coli</i> | M | Indutseeritav | D16251 | 8619599 10960087 |
| <i>mphB</i> | Ravimi modifikatsioon | <i>Escherichia coli</i> | M | Konstitutiivne | D85892 | 8900063 |
| <i>mphC</i> | Ravimi modifikatsioon | <i>Staphylococcus aureus</i> | M | Teadmata | AF167161 | – |
| <i>mphD</i> | Ravimi modifikatsioon | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | M | Teadmata | AB048591 | 11184231 |

^aLühendid: *M* makroliidid, *L* linkosamiidid, *S_B* streptogramiin B^bOn leitud nii indutseeritud kui ka konstitutiivseid isolaate^cKirjanduses märgitud kui “tõenäoliselt konstitutiivne”

Lisa 2.

Tabel 2 Resistentsusgeenide arvatavad liiderpeptiidid. (Subramanian et al., 2012)

| Nimi | Liiderpeptiidi järjestus | GenBank |
|-----------------------|--------------------------|----------|
| IAVV peptiidid | | |
| ErmAL1 | MCTCIAVVDITLSHL | AF002716 |
| ErmAL1 | MCTSIAVVEITLSHS | X03216 |
| Erm36L | MGSPSIAVTRFRRF | AF462611 |
| IFVI peptiidid | | |
| ErmAL2 | MGMFSIFVIERFHYQPNQK | AF002716 |
| ErmAL2 | MGTF SIFVINKVRYQPNQN | X03216 |
| ErmCL | MGIFSIFVISTVHYQPNKK | V01278 |
| ErmGL2 | MGLYSIFVIETVHYQNEK | M15332 |
| ErmTL | MGIFSIFVINTVHYQPNKK | M64090 |
| ErmYL | MGNCSLFVINTVHYQNEK | AB014481 |
| Erm33L | MGIFSIFVINTVHYQPNKK | AJ313523 |
| RLR peptiidid | | |
| EreAL | MLRSRAVALKQSYAL | AF099140 |
| Erm34L | MHFIRLRFLVLNK | AY234334 |
| ErmDL | MTHSMRLRFPTLNQ | M29832 |
| MefAL | MTASMRLR | AF274302 |
| MsrAL | MTASMRLK | AB016613 |
| MsrCL | MTASMKLRFELLNN | AY004350 |
| Erm39L | MSVTYIRLRIT | AY487229 |
| ErmXL | MLISGTAFLRLRTNRKAFPTP | M36726 |
| ErmQL | MIMNGGIASIRLRR | L22689 |
| EreAL | MTPNNSFKPTPLRGAA | AY183453 |
| ErmFL | MKTPTGLSGSISQVRVTLVK | M17808 |
| ErmWL | MGFSFTGSAFIRLRTA | D14532 |
| Muud peptiidid | | |
| MefBL | MYLIFM | FJ196385 |
| MsrDL | MYLIFM | AF274302 |
| ErmGL1 | MRIDDYCS | L42817 |
| MphCL | MYQIKNGN | AF167161 |
| EreAL | MSLVIGEAKV | AF512546 |
| Erm37L | MRTAPEPWGW | BX842578 |
| MphBL | MAKEALEVQGS | D85892 |
| ErmGL1 | MNKYSKRDAIN | M15332 |
| ErmEL | MRVSVRVAACARC | M11200 |
| ErmFL | MMLCCRLSFFLLSR | M62487 |
| MphAL | MNKTKGCLIANFATVPD | D16251 |
| Erm38L | MSITSMAAPVAAFIRPRTA | AY154657 |
| EreAL | MQLTVKSFVRFACYASYRN | AF512546 |
| ErmGL2 | MNHEYVLFSKNINIRKEMQ | L42817 |
| EreBL | MRIXRKTAYARPCALAEGRX | A15097 |
| EreBL | MRINRKTAYARPCALAEGRG | AB207867 |
| Erm41L | MMVLRRVRPTVATPVGLVSAH | EU177504 |
| ErmSL | MSMGIAARPPRAALLPPPSVPRSR | M19269 |

Tabel 2 (jätkub)

| Nimi | Liiderpeptiidi järjestus | GenBank |
|-------|--|----------|
| ErmBL | MLVFQMCNVDKTSTVLKQTKNSDYADK | U86375 |
| ErmBL | MLVFQMRNVDKTSTVLKQTKNSDYADK | M11180 |
| ErmTL | MRNVDKTSTVLKQTKNSDYADK | AJ488494 |
| ErmBL | MLVFQMRNVDKTSTVLKQTKNSDLRR | AF299292 |
| ErmBL | MLVFQIRNVDKTSTGLKQTKNSDYADK | AF080450 |
| ErmBL | MLVFQMRNVDKTSTILKQTKNSDYVDKYVRLIPTSD | K00551 |
| ErmBL | MLVFQMRYQMRYVDKTSTVLKQTKKSDYADK | M19270 |
| ErmFL | MLSAFIFSSFSLIYRAKLLNLPLYNYKRISL | M62487 |
| ErmNL | MARTLFAGRTELWAPAIEPPVKAATHTAVRRD | X97721 |
| ErmVL | MAANNAITNSGLGRGCAHSVRMRRGPGALTGPGSHTAR | U59450 |

LIHTLITSENTS